

Fachbereich Biologie
-Mikrobiologie-
der Philipps-Universität Marburg



**GbsR-Typ Regulatoren:
Charakterisierung einer neuen MarR-Typ Regulator Familie
von transkriptionellen Repressoren**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Stefanie Irene Ronzheimer geb. Henkel

aus Marburg

Marburg/Lahn 2015

Fachbereich Biologie
-Mikrobiologie-
der Philipps-Universität Marburg



**GbsR-Typ Regulatoren:
Charakterisierung einer neuen MarR-Typ Regulator Familie
von transkriptionellen Repressoren**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Stefanie Irene Ronzheimer geb. Henkel

aus Marburg

Marburg/Lahn 2015

Die experimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von Oktober 2012 bis September 2015 im Laboratorium für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Gutachter dieser Arbeit waren:

Erstgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung:

Meinem Mann

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	11
2.	Einleitung.....	12
2.1	Anpassung von Mikroorganismen an osmotischen Stress	12
2.2	Kompatible Solute.....	13
2.3	Aufnahme kompatibler Solute in <i>B. subtilis</i>	14
2.4	Die Synthese des kompatiblen Soluts Glycin Betain.....	15
2.5	Das Regulatorprotein GbsR aus <i>B. subtilis</i>	18
2.6	Verwandte putative GbsR Regulatorproteine	22
2.7	Das marine Bakterium <i>Bacillus infantis</i> NRRL B-14911	27
2.8	Zielsetzung	28
3.	Material & Methoden.....	29
3.1	Material	29
3.1.1	Chemikalien	29
3.1.2	Enzyme und Oligonukleotide	29
3.1.3	Medien	34
3.2	Mikrobiologische Methoden	36
3.2.1	Bakterienstämme und Plasmide	36
3.2.2	Sterilisation	40
3.2.3	Kultivierung von Bakterien.....	40
3.2.4	Ermittlung der Zelldichte	40
3.3	Molekularbiologische und genetische Methoden	41
3.3.1	Präparation, Aufarbeitung und Klonierungsverfahren von DNA	41
3.3.2	Transformation von Bakterien	43
3.3.3	Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	44
3.4	Konstruktion von Bakterienstämmen und Plasmiden	45
3.4.1	Plasmidkonstruktion	45
3.4.2	Konstruktionen von <i>treA</i> -Reporterfusionenstämmen.....	48
3.5	Biochemische Methoden.....	49
3.5.1	Nachweis der Amylase-Aktivität.....	49
3.5.2	Quantifizierung der TreA-Aktivität	49
3.5.3	Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	50
3.5.4	Heterologe Expression von GbsR in <i>B. megaterium</i>	51

3.5.5	Heterologe Expression von GbsR mit anfusioniertem Maltosebindeprotein.....	51
3.5.6	Proteinreinigung via Strep-Tag® Affinitätschromatographie	51
3.5.7	Proteinreinigung via Maltosebindeprotein-Tag Affinitätschromatographie	52
3.5.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	52
3.5.9	Gelfiltration.....	53
3.5.10	Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Bindeaffinität.....	53
3.6	Bioinformatische Analysen.....	54
4.	Ergebnisse.....	55
4.1	Verbreitung von GbsR-Typ Regulatorproteinen.....	55
4.1.1	Taxonomische Verbreitung.....	55
4.1.2	Die Transporter-Klasse	57
4.1.3	Die Osmo-unabhängige Klasse.....	63
4.1.4	Die Synthese-Klasse	64
4.1.5	Verbreitung der GbsR-Typ Regulatoren innerhalb eines Bakteriums..	68
4.2	Das GbsR Bindemotiv in <i>B. subtilis</i>	68
4.2.1	Das GbsR Bindemotiv vor <i>gbsA</i> in <i>B. subtilis</i>	68
4.2.2	Das GbsR Bindemotiv vor <i>opuBA</i> in <i>B. subtilis</i>	71
4.3	<i>In silico</i> Bindemotiv der GbsR-Typ Regulatoren der Synthese-Klasse.....	72
4.4	CudC aus <i>S. xylosus</i> C2A bindet Cholin.....	74
4.5	Das GbsR-Typ Bindemotiv der OpuB/OpuC-Untergruppe.....	76
4.6	Das <i>opu</i> Regulon im marinen <i>B. infantis</i> NRRL B-14911	77
4.6.1	Der OpuA Transporter aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911.....	77
4.6.2	Osmotische Protektion des Bakteriums <i>B. infantis</i> NRRL B-14911	80
4.6.3	Der DNA bindende Regulator OpuAR aus dem marinen <i>B. infantis</i> NRRL B-14911	84
4.6.4	Spezifität des OpuAR Bindemotivs aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911 ...	90
4.6.5	Induktoren des OpuAR Regulators aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911	91
4.7	Die Liganden Bindetasche der GbsR-Typ Regulatoren.....	95
4.7.1	Die Aromatische Ligandenbindetasche	95
4.7.2	Die Ligandenspezifität der aromatischen Bindetasche von GbsR-Typ Regulatoren	99
4.8	Stabilität von gereinigten GbsR-Typ Regulatoren.....	100
4.8.1	Versuch der oligomeren Größenbestimmung von GbsR-Typ Regulatoren	100
4.8.2	Produktion von GbsR im <i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3) RIL.....	103

4.8.3	Produktion von GbsR in <i>Bacillus megaterium</i>	105
4.8.4	Überproduktion von GbsR aus <i>B. subtilis</i> mit Maltosebindeprotein als Fusionsprotein.....	106
5.	Diskussion & Ausblick.....	108
5.1	GbsR-Typ Regulatoren regulieren osmotisch relevante Gene in <i>Bacteria</i>	108
5.2	Zusammenspiel mehrere GbsR-Typ Regulatoren.....	110
5.2.1	Getrennte Bindemotive für OpuCR und GbsR vor dem <i>opuB</i> -Operon	111
5.3	GbsR-Typ Regulation durch Protein-DNA-Interaktion.....	114
5.3.1	GbsR-Typ Regulatoren binden an palindromische Region	114
5.4	Ligandenbindung durch Kation- π Interaktion.....	117
5.4.1	Mögliche weitere Aminosäure der Ligandenbindetasche von GbsR-Typ Regulatoren entdeckt.....	117
5.4.2	Glycin Betain wird über Kation- π Interaktion von OpuAR aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911 gebunden	118
5.5	Osmoprotektion des marinen <i>B. infantis</i> NRRL B-14911	121
5.5.1	Das <i>opu</i> Regulon in <i>B. infantis</i> NRRL B-14911	122
5.6	Stabilität <i>in vitro</i> gereinigter GbsR-Typ Regulatoren.....	125
5.7	Fazit.....	126
6.	Literatur	127
7.	Anhang.....	135
8.	Danksagung	148
9.	Lebenslauf.....	149
10.	Erklärung	150

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die fünf Opu-Transporter aus <i>B. subtilis</i> .	14
Abbildung 2: Glycin Betain Synthese in <i>B. subtilis</i> .	16
Abbildung 3: Regulation der Cholin Aufnahme durch OpuB und der Glycin Betain Synthese.	17
Abbildung 4: Vorhergesagtes Bindemotiv von GbsR aus <i>B. subtilis</i> .	19
Abbildung 5: Modell der Kristallstruktur von GbsR aus <i>B. subtilis</i> (a).	20
Abbildung 6: Kristallstrukturmodell von GbsR aus <i>B. subtilis</i> mit Vergrößerung der teils putativen aromatischen Ligandenbindebox	21
Abbildung 7: Die Gencluster <i>cudTCAB</i> aus <i>Staphylococcus xylosus</i> C2A und <i>gbsURAB</i> aus <i>Halobacillus halophilus</i> .	22
Abbildung 8: Die beiden Genloki von <i>opuBR</i> (<i>yvaV</i>) und <i>opuCR</i> (<i>yvbF/opcR</i>) aus <i>B. subtilis</i> .	24
Abbildung 9: DNA Bindemotiv von OpuCR und OpuBR vor <i>opuBA</i> und <i>opuCA</i> .	25
Abbildung 10: Genomische Lage des <i>opuAR</i> aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911.	26
Abbildung 11: Die Plasmide pSTH02 & pSTH23.	45
Abbildung 12: Die Plasmide pSTH33-36:	46
Abbildung 13: Die Plasmide pSTH49 & pSTH50.	47
Abbildung 14: Das Plasmid pSTH47.	47
Abbildung 15: Das Plasmid pSTH55.	48
Abbildung 16: Taxonomische Verbreitung von <i>gbsR</i> ähnlichen Genen innerhalb der Domänen <i>Bacteria</i> und <i>Archaea</i> .	56
Abbildung 17: Übersicht der Gruppierung <i>gbsR</i> ähnlicher Gene in drei spezifische Klassen.	59
Abbildung 18: Verbreitung von <i>gbsR</i> ähnlichen Genen innerhalb der Transporter-Klasse und deren Untergruppierung.	61
Abbildung 19: Genetische Organisation verschiedener <i>gbsR</i> Genumgebungen der Transporter-Klasse.	62
Abbildung 20: Verbreitung von <i>gbsR</i> ähnlichen Genen innerhalb der Osmo-unabhängigen- Klasse.	63
Abbildung 21: Verbreitung von <i>gbsR</i> ähnlichen Genen innerhalb der Synthese-Klasse.	66
Abbildung 22: Genetische Organisation verschiedener <i>gbsR</i> Genumgebungen der Synthese- Klasse.	67

Abbildung 23: TreA Messungen der <i>gbsA</i> -Promotorregion Mutanten.	71
Abbildung 24: Lage der Bindemotive von GbsR und OpuCR vor <i>gbsA</i> und <i>opuBA</i> in <i>B. subtilis</i>	72
Abbildung 25: Ausschnitt des Sequenzvergleichs der Promotorregion mit GbsR Bindemotiv in <i>Staphylococci</i>	73
Abbildung 26: Direkter Sequenzvergleich des GbsR Bindemotivs vor <i>cudA</i> aus <i>S. xylosus</i> C2A und <i>gbsA</i> aus <i>B. subtilis</i>	74
Abbildung 27: Fluoreszenzspektroskopische Messungen von CudC aus <i>S. xylosus</i>	75
Abbildung 28: <i>OpuBA</i> - und <i>opuCA</i> -Promotorregionen mit OpuCR Bindemotiv.	77
Abbildung 29: Heterologe Komplementation von OpuA aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911.	79
Abbildung 30: Wachstum von <i>B. infantis</i> NRRL B-4911 in Basalmedium mit verschiedenen Medienzusätzen.	81
Abbildung 31: Verwertung von Cholin und Glycin Betain als Kohlenstoffquelle.	82
Abbildung 32: Wachstumsanalyse von <i>B. infantis</i> NRRL B-14911 bei steigender Osmolarität.	83
Abbildung 33: Osmoprotektion von <i>B. infantis</i> NRRL B-14911 und verschiedenen kompatiblen Soluten.	84
Abbildung 34: Regulation des <i>opuA</i> -Operons durch OpuAR in <i>B. infantis</i> NRRL B-14911.	85
Abbildung 35: Sequenzvergleich der Promotorregion alle <i>opuAA</i> Gene der OpuA-Untergruppe.	87
Abbildung 36: Ergebnisse der OpuAR Bindemutation <i>opuAA'</i> - <i>treA</i> -Fusionsmutanten.	88
Abbildung 37: Intergene Region von <i>opuAR</i> und <i>opuAA</i> aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911 mit möglichem SigA-Promotor.	89
Abbildung 38: Einfluss der GbsR-Typ Regulatoren aus <i>B. subtilis</i> auf die <i>opuAA</i> -Expression des <i>B. infantis</i> NRRL B-14911.	90
Abbildung 39: Fluoreszenzspektroskopische Messungen mit OpuAR aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911 und den beiden kompatiblen Soluten Cholin und Glycin Betain.	91
Abbildung 40: Fluoreszenzintensitätsänderung der Messungen mit OpuAR aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911 und verschiedener kompatibler Solute.	93
Abbildung 41: Bindungsaffinität von OpuAR aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911 zu Prolin Betain. Prolin Betain wird mit einer K_D von $217 \mu M \pm 37 \mu M$ gebunden.	94
Abbildung 42: Induktoren der <i>opuAA</i> Expression von <i>B. infantis</i> NRRL B-14911.	94
Abbildung 43: Reinigung aller OpuAR-Bindeboxmutanten.	96

Abbildung 44: Kristallstrukturmodell von GbsR aus <i>B. subtilis</i> mit Vergrößerung der teils putativen aromatischen Ligandenbindebox.	99
Abbildung 45: Gelfiltrationslauf von GbsR-Typ Regulatorproteinen.	101
Abbildung 46: Standardgerade der Referenzproteine auf der HiLoad Superdex 80pg.....	101
Abbildung 47: Gelfiltrationslauf von GbsR aus <i>B. subtilis</i>	102
Abbildung 48: Standardgerade der Referenzproteine auf der HiLoad Superdex 200pg.....	103
Abbildung 49: Sättigungskurve und Intensitätsänderung von im <i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3) RIL produziertem GbsR aus <i>B. subtilis</i>	104
Abbildung 50: Gelfiltrationslauf von im <i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3) RIL produziertem GbsR aus <i>B. subtilis</i>	105
Abbildung 51: Gelfiltrationslauf von im <i>B. megaterium</i> produziertem GbsR aus <i>B. subtilis</i>	106
Abbildung 52: Gelfiltrationslauf des GbsR-MBP-Fusionsproteins.	107
Abbildung 53: Modell der Regulation des <i>opuB</i> -Operons durch OpuCR und GbsR in <i>B. subtilis</i>	112
Abbildung 54: Modell zur Regulation der Genexpression des <i>opuA</i> -Operons aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911.	123
Abbildung 55: Sequenzvergleich von GbsR-Typ Regulatoren der Synthese Klasse.....	135
Abbildung 56: Übersicht des Sequenzvergleichs der kompletten Promotorregion vor <i>gbsA</i> aller <i>Staphylococci</i> der Synthese-Klasse.....	136
Abbildung 57: Übersicht des Sequenzvergleichs der kompletten Promotorregion vor den jeweiligen <i>opuBA</i> - (*) und <i>opuCA</i> -Genen der OpuB/OpuC-Untergruppe.	137
Abbildung 58: Sequenzvergleich aller GbsR-Typ Regulatoren der Transporter-Klasse.	138
Abbildung 59: Übersicht des Sequenzvergleichs der kompletten Promotorregion vor <i>opuAA</i> aus der OpuA-Untergruppe (Teil 1).....	139
Abbildung 60: Übersicht des Sequenzvergleichs der kompletten Promotorregion vor <i>opuAA</i> aus der OpuA-Untergruppe (Teil 2).....	140
Abbildung 61: EMSA der <i>gbsA</i> -Promotorregion und <i>in vitro</i> gereinigtem GbsR aus <i>B. subtilis</i>	141
Abbildung 62: EMSA mit <i>in vitro</i> gereinigtem GbsR aus <i>B. subtilis</i> und der <i>gbsA</i> -Promotorregion mit und ohne Bindemotiv aus <i>B. subtilis</i>	141
Abbildung 63: EMSA der <i>cudA</i> -Promotorregion und <i>in vitro</i> gereinigtem CudC aus <i>S. xylosus</i> C2A.	142

Abbildung 64: EMSA der <i>opuAA</i> -Promotorregion und <i>in vitro</i> gereinigtem OpuAR aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911.....	142
Abbildung 65: EMSA mit <i>in vitro</i> gereinigtem OpuAR und der <i>opuAA</i> -Promotorregion mit und ohne Bindemotiv aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911.....	143
Abbildung 66: SDS-Gele der Überproduktion und des gereinigten CudC aus <i>S. xylosus</i> C2A.	143
Abbildung 67: SDS-Gele der Überproduktion der OpuAR-Mutanten.....	143
Abbildung 68: SDS-Gele des unterschiedlich überproduzierten GbsR aus <i>B. subtilis</i>	144
Abbildung 69: Sättigungskurven der OpuAR-Mutanten.	145
Abbildung 70: Intensitätsänderung der OpuAR-Mutanten.	146
Abbildung 71: Gelfiltrationslauf der drei Markerproteine auf der HiLoad Superdex 80pg. .	147
Abbildung 72: Gelfiltrationslauf der drei Markerproteine auf HiLoad Superdex 200pg.....	147

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Alle verwendeten Oligonukleotide	29
Tabelle 2: Komplexmedium LB-Medium	34
Tabelle 3: Minimalmedium A (MMA)	35
Tabelle 4: 5x Spizizen's Minimal Medium (5xSMM)	35
Tabelle 5: 100x Spurenelemente	35
Tabelle 6: Basalmedium	35
Tabelle 7: Antibiotika, kompatible Solute und andere Medienzusätze	36
Tabelle 8: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme	36
Tabelle 9: Verwendete <i>Bacillus</i> -Stämme	37
Tabelle 10: Verwendete Plasmide	38
Tabelle 11: Übersicht aller <i>gbsA</i> -Promotorregion Mutationen	69
Tabelle 12: Übersicht aller erzeugten <i>opuAA</i> -Fusionsstämme	85
Tabelle 13: Übersicht aller <i>opuAA</i> -Promotorregion Mutationen	88
Tabelle 14: Übersicht der Bindeaffinitäten von OpuAR-Wildtyp und aller OpuAR-Mutanten zu Cholin & Glycin Betain	96

Abkürzungsverzeichnis

AHT	Anhydrotetracyclin
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare (<i>base paire</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Kohlenstoff (<i>carbon</i>)
Cml ^r	Chloramphenicol-Resistenz
C-terminal	Carboxy-terminal
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMG	Dimethylglycin
DMSP	Dimethylsulfoniopropionat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>electro mobility shift assay</i>
<i>et al.</i>	und andere, <i>et alii</i> (lateinisch)
Genta ^r	Gentamycin-Resistenz
GB	Glycin Betain
HABA	4-Hydroxyazobenzol-2-Carboxy-Säure
HB	Homobetain
Kan ^r , neo ^r	Kanamycin-Resistenz
LB	Luria Bertani
MBP	Maltosebindeprotein
MMA	Minimalmedium A
MSC	<i>multiple cloning site</i>
N	Stickstoff (<i>nitrogen</i>)
N-terminal	Amino-terminal

OD ₅₇₈	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm
PB	Prolin Betain
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pNPG	para-Nitrophenyl- α -Glucopyranosid
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sig	Sigmafaktor
Spc ^r	Spectinomycin-Resistenz
TAE	Tris-HCl/Acetat/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
U	<i>units</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
Zeo ^r	Zeocin-Resistenz

Aminosäuren Einbuchstabencode:

A	Alanin	Q	Glutamin	L	Leucin	S	Serin
R	Arginin	E	Glutaminsäure	K	Lysin	T	Threonin
N	Asparagin	G	Glycin	M	Methionin	W	Tryptophan
D	Asparaginsäure	H	Histidin	F	Phenylalanin	Y	Tyrosin
C	Cystein	I	Isoleucin	P	Prolin	V	Valin

1. Zusammenfassung

Um sich vor osmotischem Stress zu schützen akkumuliert das Bodenbakterium *Bacillus subtilis* kompatible Solute in der Zelle. Eines der wichtigsten kompatiblen Solute ist dabei Glycin Betain. Dieses Osmoprotektivum kann entweder über die Opu-Transporter von der Zelle aufgenommen werden oder aus dem Vorläufermolekül Cholin synthetisiert werden. Die Oxidation von Cholin erfolgt über die zwei Dehydrogenasen GbsB und GbsA, die im Genom von *B. subtilis* als Operon organisiert vorliegen. Neben dem Operon liegt das Gen *gbsR*, das für den Cholin-spezifischen Repressor GbsR kodiert. Dieser reguliert die Expression des *gbsAB*-Operons und die des *opuB*-Operons, das für einen Cholin-spezifischen ABC-Transporter kodiert. Liegt Cholin in der Zelle vor, bindet es an den Regulator GbsR. Dieser löst sich von der DNA und die beiden Operone können exprimiert werden.

Durch den Regulator GbsR aus *B. subtilis* ist man auf eine neue Klasse von MarR-Typ Regulatoren aufmerksam geworden (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Die Familie der GbsR-Typ Regulatoren wurde im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert. GbsR-Typ Regulatoren sind sowohl in der Domäne der *Bacteria* als auch der *Archaea* verbreitet. Die GbsR-Typ Regulatoren, die osmotisch-abhängige Gene regulieren, treten hauptsächlich in *Firmicutes* auf. Anhand ihrer genomischen Umgebung können die Regulatoren in zwei Gruppen geteilt werden. Die Transporter- und die Synthese-Klasse. GbsR-Typ Regulatoren aus der Transporter-Klasse regulieren die Expression von ABC-Transportern für kompatible Solute. Regulatoren der Synthese-Klasse reprimieren die Glycin Betain Synthesegene. Bei der Regulation der jeweils angrenzenden Operone, binden die GbsR-Regulatoren an ein für sie spezifisches und palindromisches Bindmotiv. Bei der Bindung der DNA, mit dem konservierten Winged-Helix-Motiv, binden die Regulatoren der Transporter-Klasse auf der -35 Region des Promotors, der angrenzenden Gens. Die GbsR-Typ Regulatoren der Synthese-Klasse binden als "road block" stromabwärts des Transkriptionsstarts. GbsR-Typ Regulatoren regulieren nicht nur das angrenzende Operon. Sie sind teils für die Regulation mehrerer osmotisch-abhängiger Gene zuständig. Am Beispiel des *opuB*-Operons aus *B. subtilis* konnte ein Regulationsmodell erstellt werden, an dem zwei GbsR-Typ Regulatoren involviert sind.

GbsR-Typ Regulatoren binden kompatible Solute über Kation- π Interaktion in einer Ligandenbindetasche, die sich vermutlich aus mehreren Aminosäuren zusammensetzt. GbsR-Typ Regulatoren der Synthese-Klasse scheinen ausschließlich Cholin binden zu können, Regulatoren der Transporter-Klasse hingegen mehrere verschiedene kompatible Solute. Die Zusammensetzung der Aminosäuren, die die Ligandenbindetasche bilden, scheint dabei ausschlaggebend für das Spektrum an kompatiblen Soluten, das gebunden werden kann.

Speziell das *opu* Regulon aus dem marinen *Bacillus infantis* NRRL B-14911 konnte näher charakterisiert werden. Auch ein Modell der Regulation des *opuA*-Operons konnte vorgeschlagen werden. Der im Gencluster enthaltene OpuA Transporter transportiert die gleichen kompatiblen Solute wie OpuA aus *B. subtilis*. Sie werden von dem marinen Bakterium *B. infantis* NRRL B-14911 als Osmoprotektiva genutzt.

2. Einleitung

2.1 Anpassung von Mikroorganismen an osmotischen Stress

Mikroorganismen sind in ihrer Umgebung stets wechselnden Stressfaktoren ausgesetzt. Einige wesentliche Faktoren sind dabei, Schwankungen des pH-Werts und der Temperatur, wechselnde Wasserverfügbarkeit, unterschiedliche Nährstoffangebote sowie die sich verändernde Osmolarität (Galinski & Trüper, 1994; Wood, 1999). Um unter den verschiedenen Bedingungen überleben zu können, haben Bakterien vielfältige Anpassungsmechanismen entwickelt (Csonka & Handson, 1991; Roberts, 2005). Besonders Bodenbakterien wie *Bacillus subtilis* haben oft mit der variierenden Osmolarität zu kämpfen. Steigt der Wassergehalt in der Umgebung durch starke Regenfälle an, so sinkt die Osmolarität außerhalb der Zelle. Über die semipermeable Cytoplasmamembran strömt das Wasser entlang des osmotischen Gradienten in die Zelle ein. Bei zu starkem Wassereinstrom ist dabei der Zellinnendruck, der für die Zellteilung, das Zellwachstum und die Stabilität der Zelle essentiell ist, gefährdet. Letztlich kann es bei einem zu hohen Turgor zum Platzen der Zelle kommen (Booth *et al.*, 2007; Wood, 1999). Um dies zu verhindern, entlässt die Zelle im Cytoplasma gelöste Stoffe über mechanosensitive Kanäle ins Medium (Hoffmann *et al.*, 2008). Der umgekehrte Fall liegt vor, wenn der Boden austrocknet. Da nun außerhalb der Zelle die Osmolarität höher ist als innerhalb, diffundiert das Wasser aus der Zelle heraus. Dies führt letztlich zur Plasmolyse, da der essentielle Zellinnendruck nicht aufrecht erhalten werden kann (Bremer & Krämer, 2000; Kempf & Bremer, 1998). Um sich möglichst schnell vor der Plasmolyse zu schützen, transportieren Bakterien anorganische Ionen wie K^+ in die Zelle. Gleichzeitig wird das cytotoxische Na^+ aus der Zelle geschleust. Diese, bei den meisten halophilen aber auch halotoleranten Bakterien genutzte Strategie, wird auch als "salt-in"-Strategie bezeichnet (Galinski & Trüper, 1994; Ventosa *et al.*, 1998). Ein zu hoher interner Kaliumspiegel führt zu einer Alkalisierung des Cytoplasmas und einer Erhöhung der Ionenstärke. Da so u. a. die Proteinbiosynthese gestört wird, gibt es in vielen halotoleranten Bakterien wie z. B. *B. subtilis* eine zweite Stressantwort auf zu hohe externe Osmolarität (Holtmann *et al.*, 2003; Kempf & Bremer, 1998; Krulwich, 2001). Dies wird auch als "salt-out"-Strategie bezeichnet (Bremer & Krämer, 2000). Bei dieser Stress-Antwort akkumuliert die Zelle osmotisch wirksame Schutzsubstanzen, um somit die Anzahl der gelösten Teilchen innerhalb der Zelle, der des externen Milieus anzupassen (da Costa *et al.*, 1998; Galinski, 1993). Diese aktiv wirkenden Schutzsubstanzen, die auch als kompatible Solute

bezeichnet werden, können sowohl über spezifisch Transporter gezielt in die Zelle aufgenommen, als auch *de novo* synthetisiert werden (Kempf & Bremer, 1998; Lucht & Bremer, 1994; Wood *et al.*, 2001).

2.2 Kompatible Solute

Durch die Akkumulation von kompatiblen Soluten in der Zelle wird das Überleben und das Wachstum unter verschiedenen Stressbedingungen ermöglicht (Bremer & Krämer, 2000; Kempf & Bremer, 1998). Bei osmotischem Stress beispielsweise können die Schutzsubstanzen zum einen aus ihrer Umgebung ins Zytoplasma über spezifische Transportsysteme aufgenommen oder zum anderen *de novo* von Bakterien synthetisiert werden (Galinski & Trüper, 1994). Kompatible Solute fungieren nicht nur als osmotische Schutzsubstanzen, sondern können Zellen auch vor Hitze- und Kältestress schützen (Hoffmann & Bremer, 2011; Holtmann & Bremer, 2004). Im Zytoplasma können die organischen Verbindungen bis zu Molaren Konzentrationen akkumuliert werden, da sie nicht mit den Proteinen der Zelle interagieren, ladungsneutral und gut in Wasser löslich sind. Somit haben kompatible Solute keine negativen Auswirkungen auf zelluläre Prozesse wie die Proteinfaltung, DNA- und RNA-Synthese oder den Kata- bzw. dem Anabolismus der Zelle (Csonka, 1989). Kompatible Solute werden auf Grund ihrer stabilisierenden Eigenschaften auf Proteine und andere Makromoleküle auch als "chemische Chaperone" bezeichnet (Diamant *et al.*, 2001). Hierbei besagt das Modell des "preferential exclusion", dass die kompatiblen Solute aus der Hydrathülle der Proteine ausgeschlossen werden und dadurch die Proteine eine für sie energetisch günstige Konformation einnehmen (Knapp *et al.*, 1999; Street *et al.*, 2006). Anwendung finden kompatible Solute nicht nur in Bakterien, sondern auch in Archaeen und eukaryotischen Zellen (Doige & Ames, 1993; Higgins, 1992; Roesser & Mueller, 2001).

Kompatible Solute sind in verschiedenen Stoffklassen zu finden: Sie sind z. B. unter den Aminosäuren und deren Derivaten zu finden (Glutamat, Prolin, Ectoin und Prolin Betain), unter den Zuckern und Polyolen (Trehalose und Glycerin) und zudem bei den Methylsulfonium-Verbindung und den Sulfateestern (Cholin-O-Sulfat). Außerdem zählen Dimethylsulfoniumpropionat, Dimethylsulfoniumpropionat, und letztlich auch die Trimethylammonium-Verbindungen wie Glycin Betain, Cholin (hat keine osmoprotektiven Eigenschaften *per se*), Homobetain (Trimethyl- α -propionat), γ -Butyrobetain und das Intermediat der Glycin Betain-Synthese Dimethylglycin dazu (Bashir *et al.*, 2014a; Bremer, 2001; Kempf & Bremer, 1998).

2.3 Aufnahme kompatibler Solute in *B. subtilis*

B. subtilis ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges und petrich begeißeltes Bakterium, das überwiegend in den oberen Bodenschichten vorkommt (Earl *et al.*, 2010). *B. subtilis* bevorzugt die aerobe Lebensweise, kann aber auch bei Sauerstoffmangel anaerob wachsen (Hartig & Jahn, 2012). Das Bakterium kann sehr schnell auf physiologischen Stress reagieren (Hecker *et al.*, 1996) und ist zudem in der Lage hitzeresistente Endosporen bei Nahrungslimitation zu bilden (Takamatsu & Watabe, 2002). Zudem gilt *B. subtilis* als Modellorganismus im Fachgebiet der Mikrobiologie, da er aufgrund seiner natürlichen Kompetenz einfach genetisch zu manipulieren ist und sein Genom bereits vor längerer Zeit komplett sequenziert wurde (Kunst *et al.*, 1997). Die Aufnahme von kompatiblen Soluten in *B. subtilis* erfolgt über die fünf bisher bekannten "osmoprotectant uptake" (Opu) Systeme (Abbildung 1). Dabei variiert das Substratspektrum der einzelnen Transporter für die verschiedenen kompatiblen Solute (Bremer, 2001; Kempf & Bremer, 1998). Die Transporter OpuA, OpuB, OpuD und OpuE sind dabei meist auf nur ein oder sehr wenige Substrate spezifiziert, während vor allem OpuC ein breites Spektrum an kompatiblen Soluten aufnehmen kann (Abbildung 1) (von Blohn *et al.*, 1997; Bremer, 2001; Kappes *et al.*, 1999).

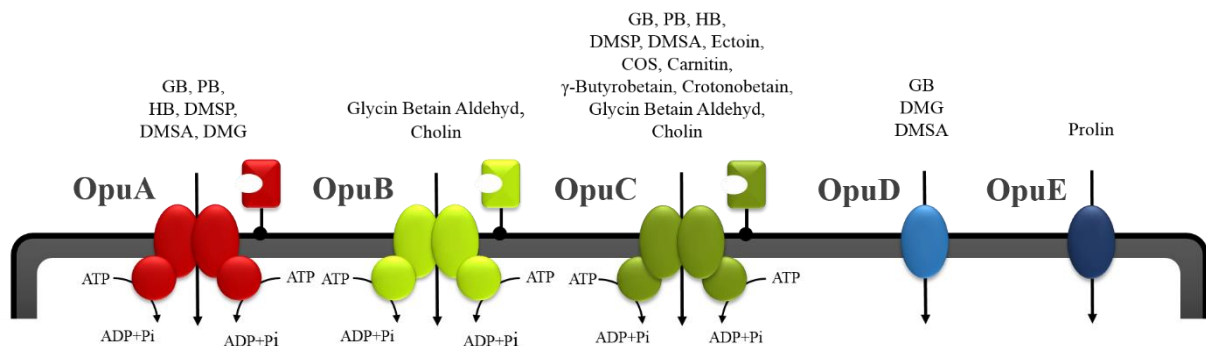


Abbildung 1: Die fünf Opu-Transporter aus *B. subtilis*.

Dargestellt sind zum einen die drei ABC-Transporter OpuA, OpuB und OpuC. Sie bestehen aus den drei Komponenten, dem ATP Bindeprotein, der Permease und dem Substratbindeprotein. Zum anderen sind die Einkomponenten-Transporter OpuD und OpuE eingezeichnet. Anbei ist das Substratspektrum des jeweiligen Transporters zu sehen.

Die Opu-Transporter gehören zu den Familien der Primären- und Sekundären-Transportern. Dabei zählen die beiden Einkomponenten-Transporter OpuD und OpuE zur Familie der Sekundären-Transportern. Während der Prolin-spezifische OpuE Transporter näher zur SSS-Unterfamilie ("sodium/solute symporter family") gehört (von Blohn *et al.*, 1997), zählt OpuD zur Unterfamilie der Trimethylammonium Aufnahmesysteme (BCCT, "betain-choline-carnitin-transporter") (Ziegler *et al.*, 2010). OpuD transportiert neben DMG und DMSA

hauptsächlich Glycin Betain (Bashir *et al.*, 2014a; Hoffmann & Bremer, 2011; Kappes & Kempf, 1996). OpuA, OpuB und OpuC sind drei Transporter der Familie der Primären-Transporter, die zu den ABC-Transportern ("ATP binding cassette"; Higgins, 1992) gehören. Diese Transporter bestehen aus drei Komponenten. Der ATPase, der Permease und dem extrazellulären Substratbindeprotein, das über einen Lipidanker an der Zytoplasmamembran von *B. subtilis* befestigt ist (Kappes & Kempf, 1996; Kempf & Bremer, 1998; Kempf *et al.*, 1997). OpuA besitzt an sich ein weites Aufnahmespektrum für kompatible Solute. Hierzu zählen Glycin Betain, Prolin Betain, DMSA, DMSP, DMG und HB. Besonders gut wird allerdings Glycin Betain von OpuA transportiert (Bashir *et al.*, 2014a, 2014b; Broy *et al.*, 2015; Holtmann & Bremer, 2004; Horn *et al.*, 2005; Kempf & Bremer, 1995; Smits *et al.*, 2008). OpuC hat das größte Aufnahmespektrum aller Opu-Transporter. Neben den kompatiblen Soluten, die auch OpuA aufnehmen kann (DMG nur sehr schlecht), ist für OpuC zusätzlich der Transport von Ectoin, Cholin, COS, Carnitin, γ -Butyrobetain und Crotonobetain möglich (Bashir *et al.*, 2014a; Broy *et al.*, 2015; Jebbar *et al.*, 1997; Kappes & Bremer, 1998). Der nächste verwandte ABC-Transporter von OpuC ist OpuB. Aufgrund der sehr ähnlichen Sequenz der einzelnen Transporterkomponenten (69 – 85 %) und der unmittelbaren Nachbarschaft der codierenden Gene auf dem Genom, geht man davon aus, dass sie aus einer Genduplikation entstanden sind (Kappes *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu OpuC transportiert das hochspezifische OpuB allerdings nur das kompatible Solut Cholin und das Intermediat der Glycin Betain Synthese, Glycin Betain Aldehyd (Bremer, 2001; Kappes *et al.*, 1999; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Für die Spezialisierung auf den Cholintransport ist u. a. die Aminosäure D⁷⁴ im Substratbindeprotein OpuBC verantwortlich (Broy, 2015).

2.4 Die Synthese des kompatiblen Solut Glycin Betain

Glycin Betain ist eines der meistgenutzten und weitverbreitetsten kompatiblen Solute in der Natur (Yancey, 2005). Viele Mikroorganismen können es entweder synthetisieren oder aus der Umwelt aufnehmen (Csonka & Handson, 1991; Kempf & Bremer, 1998; Poolmann & Glaeser, 1998). Glycin Betain kann entweder durch die schrittweise Methylierung der Aminosäure Glycin (Kimura *et al.*, 2010; Nyssölä *et al.*, 2000; Waditee *et al.*, 2005) oder durch die Oxidation des zuvor aufgenommenen Cholins synthetisiert werden (Boch *et al.*, 1996; Lamark *et al.*, 1991; Rosenstein *et al.*, 1999).

Bei der *de novo* Synthese aus Glycin, die von extrem halophilen *Archaea*, Schwefelbakterien und manchen Cyanobakterien genutzt wird, wird Glycin über drei Methylierungsschritte zu

Glycin Betain umgewandelt. Daran beteiligt sind die Glycin-Sarkosin-Methyltransferase und die Sarkosin-Dimethylglycin-Methyltransferase. Intermediate der Synthese sind Monomethylglycin (Sarkosin) und Dimethylglycin (DMG) (Kimura *et al.*, 2010; Nyssölä *et al.*, 2000; Waditee *et al.*, 2005). S-Adenosyl-Methionin dient dabei als Methyl-Gruppen-Donor (Galinski & Trüper, 1994). Für die Regeneration einer Methylgruppe des S-Adenosyl-Methionin werden zwölf ATP Äquivalente verwendet (Atkinson, 1977). Die *de novo* Synthese von Glycin Betain ist energetisch gesehen daher sehr hoch für die Zelle (Kimura *et al.*, 2010). Sie ist unter den heterotrophen Bakterien deshalb nur wenig verbreitet. *B. subtilis* ist nicht in der Lage das Osmoprotektivum Glycin Betain aus Glycin *de novo* herzustellen. Neben *B. subtilis* stellen viele Pflanzen und Tiere Glycin Betain aus dem Vorläufermolekül Cholin her. Dabei wird in zwei Oxidationsschritten Cholin über das Intermediat Glycin Betain Aldehyd letztlich zu Glycin Betain umgewandelt (Abbildung 2). Die beteiligten Enzyme bei der Oxidation von Cholin zu Glycin Betain können je nach Organismus variieren (Bremer & Krämer, 2000). Für die Oxidationvorgänge in *B. subtilis* ist zum einen die Alkohol-Dehydrogenase (Typ III) GbsB und zum anderen die Glycin-Betain-Aldehyd-Dehydrogenase zuständig. Beide Enzyme sind NAD^+ -abhängig (Boch *et al.*, 1996, 1997).

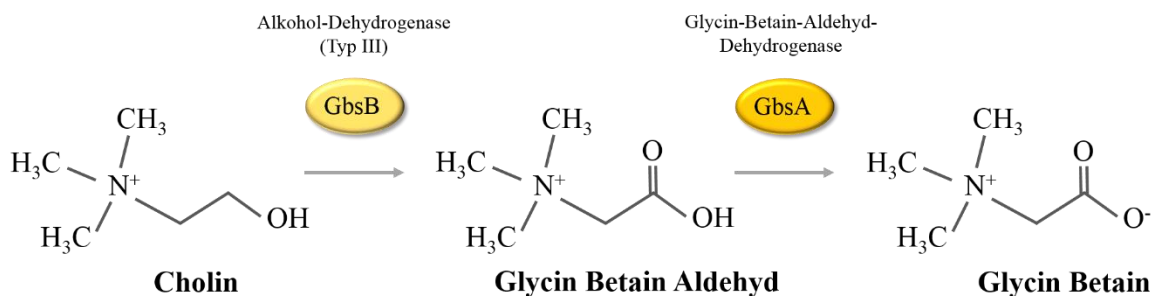


Abbildung 2: Glycin Betain Synthese in *B. subtilis*

Dargestellt ist die Synthese des kompatiblen Soluts Glycin Betain aus dem Vorläufermolekül Cholin über eine zweistufige Oxidation durch die beiden Dehydrogenase GbsB und GbsA. Abbildung modifiziert nach Pittelkow *et al.* (2011).

Die beiden kodierenden Gene der Dehydrogenasen GbsB und GbsA sind im Genom von *B. subtilis* in einem Operon (*gbsAB*) organisiert. Direkt vor dem Operon ist in entgegengesetzter Orientierung das Gen des Cholin-abhängige Repressors GbsR ("glycine betaine synthesis regulator") zu finden (Abbildung 3) (Boch *et al.*, 1996; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Liegt kein Cholin in der Zelle vor, so bindet der Repressor im Bereich der intergenen Region zwischen *gbsR* und *gbsA* und verhindert somit die Expression des *gbsAB*-Operons. Sobald Cholin in der Zelle vorliegt, löst sich der Regulator von der DNA und die Gene für die Glycin Betain Synthese können exprimiert werden. Hierfür reichen bereits sehr geringe Mengen Cholin (25 μM) im

Medium aus. Auch das für die Zelle schädliche und eher selten in der Natur frei vorliegende Intermediat des Glycin Betain Synthesewegs Glycin Betain Aldehyd dient als Induktor des *gbsAB*-Operons (Nau-Wagner *et al.*, 2012).

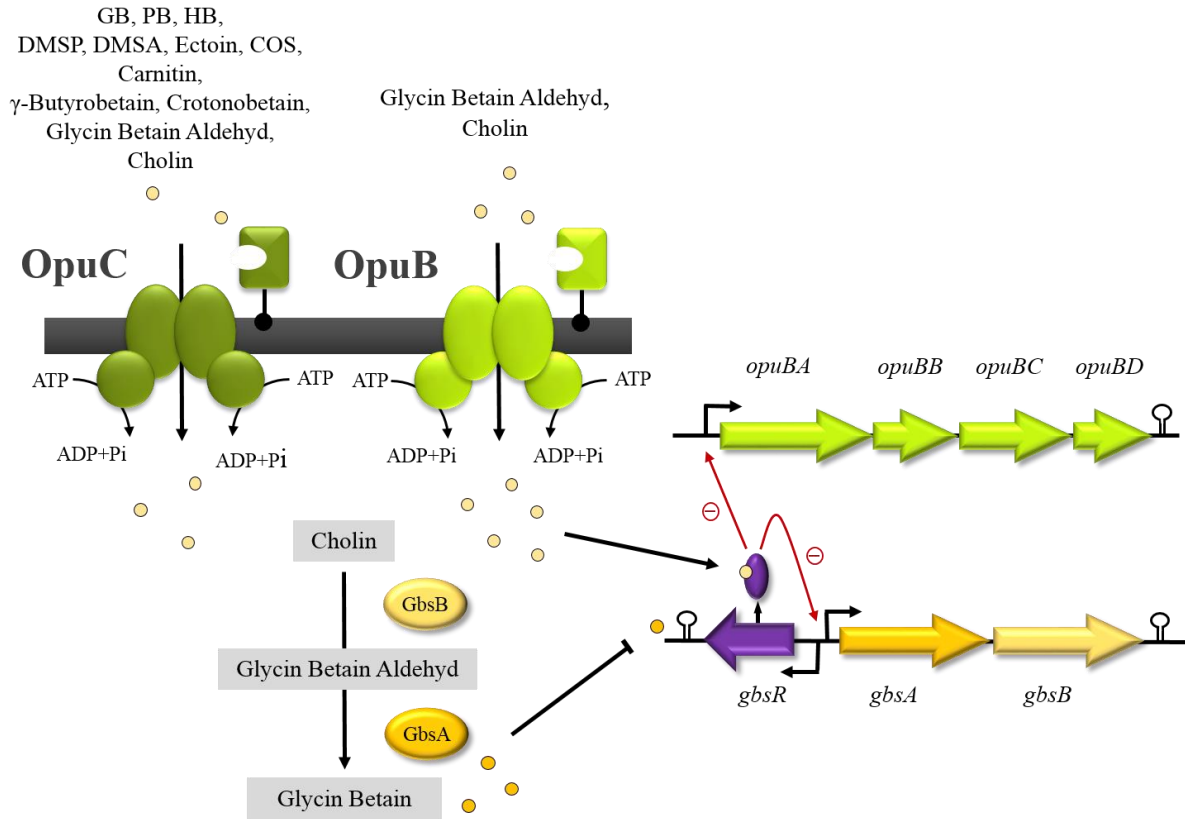


Abbildung 3: Regulation der Cholin Aufnahme durch OpuB und der Glycin Betain Synthese.

In Abwesenheit von Cholin reprimiert GbsR die Expression des *gbsAB*-Operons und die des *opuB*-Operons, das für den Cholin-spezifischen ABC-Transporter OpuB kodiert. Gelangt Cholin durch OpuB oder OpuC in die Zelle, bindet es an den Repressor. GbsR löst sich von der DNA, wodurch die Expression beider Operone möglich ist. Liegt genügend aus Cholin synthetisiertes Glycin Betain vor, setzt sich GbsR wieder auf die DNA. Abbildung modifiziert nach Nau-Wagner *et al.* (2012).

Der Transport von Cholin in die Zelle findet über die beiden ABC-Transporter OpuB und OpuC statt. Während OpuB der Cholin-spezifische Transporter ist, hat OpuC ein sehr breites Substratspektrum (Bremer, 2001; Jebbar *et al.*, 1997; Kappes & Bremer, 1998; Kappes & Kempf, 1996; Kappes *et al.*, 1999; Nau-Wagner *et al.*, 1999; Pittelkow *et al.*, 2011). Auch das für den OpuB Transporter kodierende *opuB*-Operon wird durch den Cholin-sensitiven Repressor GbsR reguliert. Somit bewirkt die Bindung von Cholin an GbsR, die *in vitro* mit einer K_D von $165 \pm 15 \mu\text{M}$ stattfindet, letztlich die verstärkte Aufnahme von Cholin in die Zelle durch OpuB. Im Gegensatz zum *gbsAB*-Operon ist das *opuB*-Operon zudem noch osmotisch induziert (Kappes *et al.*, 1999; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Da OpuC ebenfalls Cholin transportiert, könnte angenommen werden, dass die Expression des *opuC*-Operon ebenfalls

durch GbsR reguliert ist. Das ist allerdings nicht der Fall (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Neben Cholin werden viele weitere kompatible Solute von OpuC transportiert. Demnach macht eine Regulation, die lediglich sensitiv auf eines dieser Moleküle reagiert, keinen physiologischen Sinn (Kappes *et al.*, 1999; Nau-Wagner *et al.*, 2012).

Liegt Glycin Betain in ausreichender Menge in der Zelle vor, kann ein inhibitorischer Effekt auf die Transkription des *gbsAB*-Operons in Anwesenheit von Cholin beobachtet werden. Daran beteiligt ist ebenfalls das Repressorprotein GbsR (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Da bisher keine direkte Bindung des Osmoprotektivums Glycin Betain an GbsR nachgewiesen werden konnte, ist nicht geklärt, wie der negative "Feedback loop"-Mechanismus stattfindet. Vermutet wird, dass es eine kompetitive Bindung von Cholin und Glycin Betain in einer Bindetasche von GbsR gibt. Vorzustellen ist auch, dass es zwei Ligandenbindetaschen in GbsR gibt oder, dass durch einen "chemischen Chaperon"-Effekt von Glycin Betain, GbsR bei der Bindung an die DNA gehindert wird (Nau-Wagner *et al.*, 2012).

2.5 Das Regulatorprotein GbsR aus *B. subtilis*

Das *gbsR*-Gen liegt auf dem Genom von *B. subtilis* in entgegengesetzter Orientierung vor dem *gbsAB*-Operon, das für die beiden Dehydrogenasen des Glycin Betain Synthesewegs kodiert. Das Protein GbsR besteht aus 180 Aminosäure (21 kDa) und gehört laut bioinformatischen Studien zur MarR-Familie von transkriptionellen Regulatoren ("multiple antibiotic resistance regulator"). Im N-terminalen Bereich des Proteins ist das für MarR-Typ Regulatoren typische Winged-Helix-Motiv zu finden, mit dem an die palindromische DNA Region gebunden wird (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Wilkinson & Grove, 2006). Die genaue Region, in der GbsR vor *gbsA* bzw. *opuBA* an der DNA bindet ist bisher nicht bekannt. In Nau-Wagner *et al.* (2012) wird ein potenzielles "mirror repeat"-DNA-Bindemotiv vorgeschlagen, das vor *gbsA* und *opuBA* identisch ist, nicht aber vor *opuCA*. Dies entspräche auch dem identifizierten Regulationsschema, bei dem GbsR nur das *gbsAB*- und *opuB*-Operon, allerdings nicht das *opuC*-Operon reguliert (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Die genaue vorhergesagte Region kann Abbildung 4 entnommen werden. Dass es sich hierbei allerdings um das falsche Bindemotiv handelt, konnte bereits durch Mutanten in dieser Binderegion gezeigt werden (Rolbetzki, A. & Hoffmann, T.; unveröffentlicht). Typischerweise binden MarR-Typ Regulatoren an ein palindromisches Bindemotiv (Wilkinson & Grove, 2006).



Abbildung 4: Vorhergesagtes Bindemotiv von GbsR aus *B. subtilis*.

Dargestellt sind Ausschnitte der intergenen Regionen zwischen *gbsR-gbsA*, *yvaV-opuBA* und *opCR-opuCA* in *B. subtilis*. In grau unterlegt sind die beiden -35 und -10 Sequenzen der SigA-Promotoren von *opuBA* bzw *opuCA*. Mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet ist jeweils der Transkriptionsstart. Die aufeinander zulaufenden Pfeile kennzeichnen die putative Binderegion von GbsR nach Nau-Wagner *et al.* (2012), die vor *gbsA* und *opuBA* identisch ist, nicht aber vor *opuCA*. Die Unterschiede der Basen sind in dieser Region mit Sternen markiert. Die rosa hinterlegte Region ist das vorhergesagte GbsR Bindemotiv nach Leyn *et al.* (2013) vor *gbsA*. Vor *opuBA* wurde von Leyn *et al.* (2013) kein GbsR Bindemotiv bestimmt. Abbildung modifiziert nach Nau-Wagner *et al.* (2012).

Bisher gibt es eine weitere Spekulation über die putative Binderegion von GbsR vor *gbsA* in *B. subtilis*. Leyn *et al.* (2013) haben durch sequenzvergleichende Analysen mit der DNA Region von *B. subtilis* und der aus zehn weiteren *Bacilli* einen konservierten Bereich vor verschiedenen *gbsA*-Genen bestimmen können. Bei der Region handelt es sich in *B. subtilis* um folgende Sequenz: -TTAAATTTTTTTTATTTAA-. Enthalten in dieser Sequenz ist ein Palindrom, dessen genaue Lage Abbildung 4 gezeigt wird. Das von Leyn *et al.* (2013) vorhergesagte Bindemotiv von GbsR liegt etwas stromaufwärts, ausgehend von dem aus Nau-Wagner *et al.* (2012). Genau diese Region konnte ebenfalls in der Bachelorarbeit von Schumann (2015) durch bioinformatische Analysen als hoch konservierte Region bestätigt werden. Demnach fungiert GbsR als "road block", indem GbsR die RNA-Polymerase bei der Transkription der Gene blockiert. Das Bindemotiv von GbsR vor *opuBA* ist nicht von Leyn *et al.* (2013) bestimmt worden.

Nau-Wagner *et al.* (2012) konnte zudem eine *in silico* Modell der Kristallstruktur von GbsR erstellen. Dieses basiert auf der bereits kristallisierten Proteinstruktur des verwandten Regulator Mj223 (PDB Code 1ku9) aus dem extrem thermophilen methanbildenden Archaeon *Methanococcus jannaschii* (Bult *et al.*, 1996; Ray *et al.*, 2003). Beide Proteine weisen eine 34 %ige Aminosäuresequenzidentität zueinander auf. Bei Mj223 handelt es sich um ein DNA bindendes Protein, das vielleicht in der Regulation von Antibiotika-Resistenzgenen beteiligt ist. Bei der Kristallstruktur von Mj223 handelt es sich um ein Homodimer. Das Monomer besitzt ein N-terminales Winged-Helix-Motiv (Gajiwala & Burley, 2000; Ray *et al.*, 2003). Im C-terminalen Bereich befindet sich die Dimerisierungsdomäne, die aus zwei α -Helices besteht. Man geht davon aus, dass Mj223 bei der Bindung an die DNA eine starke

Konformationsänderung vornehmen muss. Nur so können die Winged-Helix-Motive von Mj223 eine Bindung mit den Basen der großen Furche einnehmen. Diese notwendige Bewegung ist vermutlich dank einer flexiblen Linkerregion möglich, die als Verbindung zwischen Dimerisierungsdomäne und DNA-bindendem Bereich liegt. Ein Bereich, der für die Bindung eines Liganden zuständig ist, konnte für Mj223 aus *M. jannaschii* nicht identifiziert werden (Ray *et al.*, 2003).

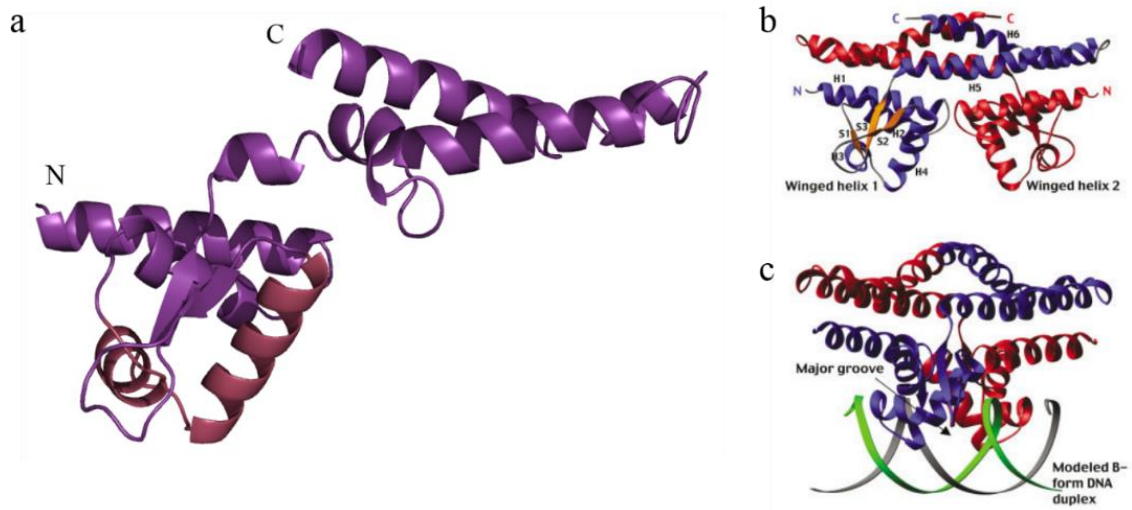


Abbildung 5: Modell der Kristallstruktur von GbsR aus *B. subtilis* (a)

Bordeaux hervorgehoben ist das DNA Bindemotiv. (b) zeigt die gelöste Kristallstruktur als Homodimer von Mj223 aus *M. jannaschii*. In (c) ist die vermutete Konformationsänderung von Mj223 zu sehen, die für die Bindung an die DNA notwendig ist. Abbildung (b) und (c) sind entnommen aus (Ray *et al.*, 2003).

Das anhand der Homepage SWISS-Model erhaltene Modell der Proteinstruktur für GbsR aus *B. subtilis* ist in Abbildung 5 zu sehen. Anhand dessen konnte für den Bereich der AS 49 bis 73 das Winged-Helix-Motiv vorhergesagt werden. Die putative Dimerisierungsdomäne wird von Aminosäure 95 bis 161 vermutet. Es wird geschätzt, dass der flexible Linker, der beide Bereiche verbindet, sich von Aminosäure 74 bis 94 erstreckt. Genau in dieser Region liegen vier Phenylalanine (F⁹⁶, F⁹⁹, F¹⁰² und F¹⁰³), die anhand ihrer Formation laut Nau-Wagner *et al.* (2012) eine mögliche Ligandenbindetasche für den bekannten Liganden Cholin bilden könnten (Abbildung 6). Dass zumindest zwei dieser Phenylalanine an der Bindung zu Cholin beteiligt sind, konnte von Henkel (2010) in ihrer Bachelorarbeit an dem homologen Protein OpuAR aus *Bacillus infantis* NRRL B-19411 gezeigt werden. Hierbei kommt die Bindung der aromatischen Aminosäuren zum Liganden über eine Kation- π Interaktion zustande. Der Mechanismus der Kation- π Interaktion ist bereits von mehreren Cholin-bindenden Proteinen bekannt, die mit ihrem Liganden in hochauflösenden Kristallstrukturen bestimmt werden konnten. Es handelt

sich dabei um drei Substratbindepoteine verschiedener ABC-Transporter. Zum einen um ChoX aus *Sinorhizobium meliloti* (Oswald *et al.*, 2008; Abbildung 6 (b)) und zum anderen um OpuBC und OpuCC aus *B. subtilis* (Du *et al.*, 2011; Pittelkow *et al.*, 2011). Alle drei Bindepoteine besitzen einen "aromatic cage", der sich im Aufbau ähnelt (Bremer, 2011). Die Bindetaschen bestehen aus vier aromatischen Aminosäuren, die so präzise angeordnet sind, dass sich die Trimethylammonium-Kopfgruppe von Cholin hineinfügen kann. Zudem befinden sich noch weitere, nicht aromatische Aminosäuren in der Ligandenbindetasche, die eine stabilisierende Wirkung auf die Bindung des Liganden haben oder für die Bindungsspezifität des Proteins zuständig sind (Broy, 2015; Du *et al.*, 2011; Oswald *et al.*, 2008; Pittelkow *et al.*, 2011). Bei der Bindung des Liganden über die Kation- π Interaktion tritt die positiv geladene Trimethylammonium-Kopfgruppe des Cholins in Wechselwirkung mit dem elektronegativ geladenen Oberflächenpotenzial der Aromaten (Dougherty, 1996). Die Stärke der Kationen- π Interaktion unterscheidet sich je nach elektrostatischen Potenzial des Aromaten. Das stärkste Potenzial unter den aromatischen Aminosäuren hat das Tryptophan. Darauf folgt das Tyrosin und letztlich das Phenylalanin (Ma & Dougherty, 1997).

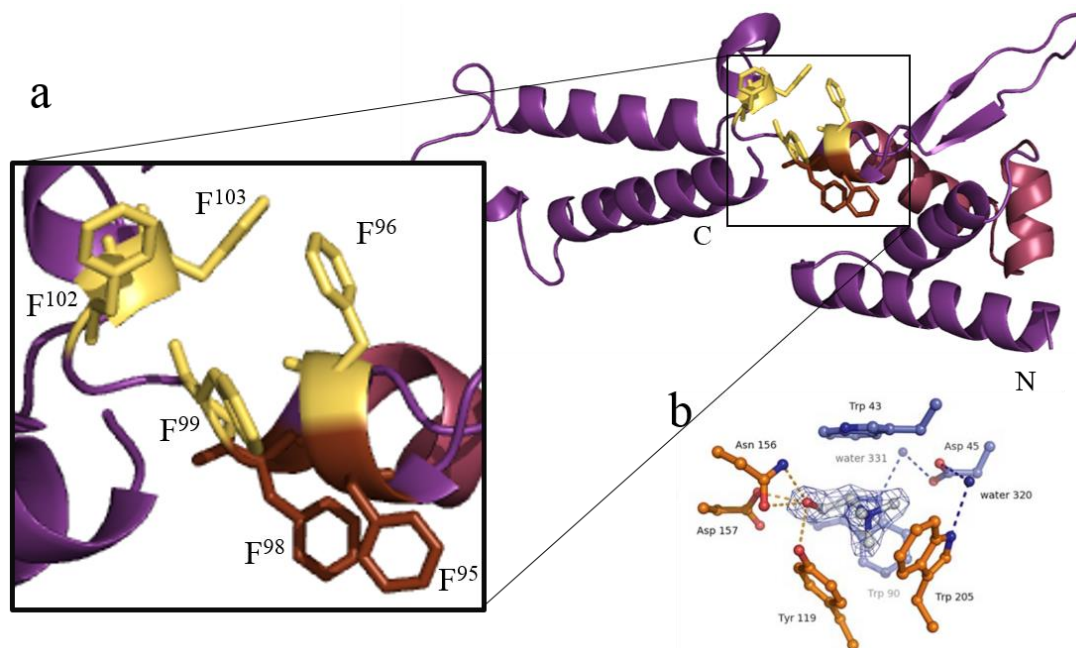


Abbildung 6: Kristallstrukturmodell von GbsR aus *B. subtilis* mit Vergrößerung der teils putativen aromatischen Ligandenbindebox

(a). In gelb dargestellt, sind die bisher bekannten Phenylalanine aus Nau-Wagner *et al.* (2012). Die beiden braun markierten Phenylalanine sind möglicherweise auch in die Bindung des Liganden Cholin involviert. (b) zeigt die aromatische Bindetasche des Substratbindepoteins ChoX aus *S. meliloti*, das seinen Liganden Cholin über Kation- π Interaktion bindet. Abbildung entnommen aus (Oswald *et al.*, 2008).

Im GbsR Modell der *in silico* Kristallstruktur fallen in dieser aromatenreichen Linkerregion des GbsRs noch zwei weitere Phenylalanine (F⁹⁵ und F⁹⁸) auf, die ebenfalls an der Bindung des Liganden Cholin beteiligt sein könnten. Die beiden Aromaten sind in Abbildung 6 braun gekennzeichnet. Zwar stehen die beiden Aminosäuren etwas außerhalb des "aromatic cage", allerdings handelt es sich bei der Kristallstruktur lediglich um ein Modell. Das Modell beruht zudem auf der Grundlage eines MarR-Typ Regulators (Mj223 aus *M. jannashii*), der selbst keine Ligandenbindebox aufzuweisen scheint. Die genaue Anordnung der Aromaten im Modell ist demnach vermutlich nicht wie es im Modell dargestellt ist (Abbildung 6). Vorstellbar ist dennoch, dass alle sechs vorhandenen Phenylalanine in Wechselwirkung mit Cholin treten.

2.6 Verwandte putative GbsR Regulatorproteine

Anhand von BLAST-Analysen im Internet konnten Nau-Wagner *et al.* (2012) weitere mit GbsR verwandte putative Regulatoren in anderen *Bacillus*- und *Staphylococcus*-Stämmen identifizieren. Dabei stellte sich heraus, dass GbsR-Typ Regulatoren anhand ihrer Genumgebung in zwei Gruppen unterteilt werden können. Die erste Gruppe enthält analog zu *gbsR* aus *B. subtilis*, angrenzend an die Gene des GbsR ähnlichen Proteins, *gbsAB*-Typ Gene. In der zweiten Gruppe sind benachbarte Gene mit Annotation für ABC-Transporter zu finden. Ein GbsR-Typ Regulator taucht in *Staphylococcus xylosus* C2A auf. Die beiden Proteine GbsR aus *B. subtilis* und CudC aus *S. xylosus* weisen eine Aminosäuresequenzidentität von 54 % auf. Das für CudC kodierende Gen liegt im bereits teilweise untersuchten *cudTCAB* Gencluster. Das Gencluster enthält zum einen die Glycin Betain Synthese Gene (*cudAB*) und zum anderen das Gen für einen Cholin Transporter, der zur BCCT Familie gehört (Rosenstein *et al.*, 1999). Die genaue Anordnung und Orientierung der Gene zeigt Abbildung 7.

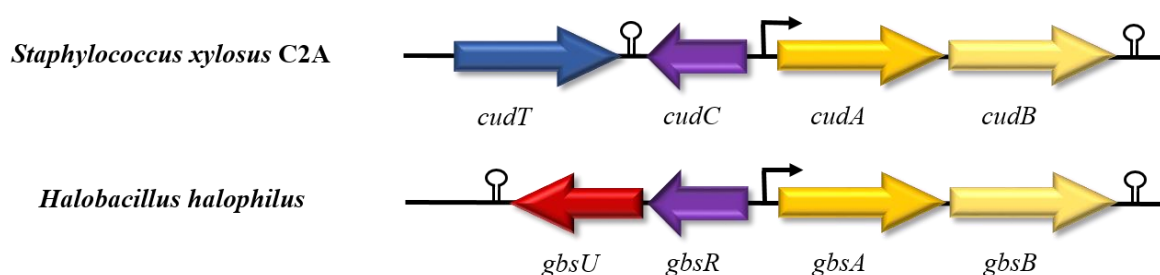


Abbildung 7: Die Gencluster *cudTCAB* aus *Staphylococcus xylosus* C2A und *gbsURAB* aus *Halobacillus halophilus*.

Zusätzlich zum analogen *gbsR-gbsAB* Genlokus aus *B. subtilis*, ist in *S. xylosus* C2A ein Gen für einen Cholin-transportierenden BCCT-Typ Transporter zu finden (blauer Pfeil) und in *Halobacillus halophilus* ein Gen, das vermutlich für ein Substratbindepotein eines ABC Transporters für kompatible Solute kodiert (roter Pfeil).

Es liegt die Vermutung nahe, dass CudC genau wie GbsR für die Regulation des *cudAB*-Operons zuständig ist. Außerdem ist denkbar, dass CudC aus *S. xylosus* C2A zudem die Expression des angrenzenden *cudT*-Gens steuert, das für den BCCT-Typ Transporter kodiert (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Rosenstein *et al.*, 1999). Nau-Wagner *et al.* (2012) konnte zudem feststellen, dass in bis dahin allen sequenzierten *Staphylococcus*-Stämmen ein solches Gencluster zu finden ist, wie es für *S. xylosus* C2A beschrieben ist.

Bisher sind zwei weitere Glycin Betain Synthesegene in *Halobacillus dabanensis* (Gu *et al.*, 2008) und *Halobacillus halophilus* (Burkhardt *et al.*, 2009) analysiert. Neben den *gbsAB*-Operonen liegt ebenfalls ein Gen für einen putativen GbsR-Typ Regulator. Im selben Transkript des *gbsR* (bzw. des *gbsI*), aber antilinear zum *gbsAB* orientiert, befindet sich zudem ein putatives Substratbindeprotein eines ABC-Transporters (*gbsT* bzw. *gbsU*) (Abbildung 7). Das Substratbindeprotein scheint Glycin Betain bzw. andere Osmoprotektiva mit Trimethylammonium- oder Dimethylsulfonium-Kopfgruppe binden zu können, wie ein *in silico* Vergleich der Aminosäuresequenzen nahe legt (Burkhardt *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2008; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Die beiden GbsR-Typ Regulatoren aus *Halobacillus dabanensis* und *Halobacillus halophilus* wurden biochemisch nicht weiter untersucht. Burkhardt *et al.* (2009) beobachtete allerdings eine Induktion der *Halobacillus halophilus gbsAB*- und *gbsRU*-Transkription in Anwesenheit von Cholin und eine Repression wenn Glycin Betain im Medium vorliegt. Diese Beobachtungen lassen auf eine GbsR analoge Regulation schließen, wie sie in *B. subtilis* für GbsR beschrieben ist (Nau-Wagner *et al.*, 2012).

In *B. subtilis* gibt es neben GbsR selbst, noch zwei weitere GbsR-Homologe. Zum einen YvaV, dessen Gen neben dem *opuB*-Operon in umgekehrter Orientierung liegt und zum anderen YvbF, das antilinear zum angrenzenden *opuC*-Operon angeordnet ist (Abbildung 8). Die benachbarten Operone kodieren für die beiden nahe verwandten ABC-Transporter OpuB und OpuC (Kappes *et al.*, 1999). Das *yvbF*-Gen bekam aufgrund seiner Lage und seiner regulatorischen Funktion, der Repression des angrenzenden *opuC*-Operons, den neuen Namen *opcR* (Lee *et al.*, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit werden die Gene im Folgenden als *opuBR* (osmoprotectant uptake opuB Regulator) statt *yvaV* und *opuCR* (osmoprotectant uptake opuC Regulator) anstatt *yvbF* bzw. *opCR* bezeichnet.

Zum Regulator GbsR (180 AS) weisen die beiden Proteine OpuBR (177 AS) und OpuCR (180 AS) eine Aminosäuresequenzidentität von 34 % bzw. 35 % auf (Nau-Wagner *et al.*, 2012). OpuBR und OpuCR gehören wie auch GbsR zur Familie der MarR-Typ Regulatoren (Leyn *et al.*, 2013). Wie für GbsR selbst, konnte auch bei OpuCR ein Winged-Helix-Motiv von Aminosäure 47 bis 68 identifiziert werden (Lee *et al.*, 2013). Da GbsR zusätzlich zum

angrenzenden *gbsAB*-Operon die Expression des *opuB*-Operons reguliert (Nau-Wagner *et al.*, 2012), liegt die Vermutung nahe, dass eine solche Kreuzregulation ebenfalls durch OpuBR bzw. OpuCR auf das *gbsAB*-Operon stattfindet. Allerdings zeigt weder OpuBR noch OpuCR einen Einfluss auf die Genexpression des *gbsAB*-Operons (Nau-Wagner *et al.*, 2012).

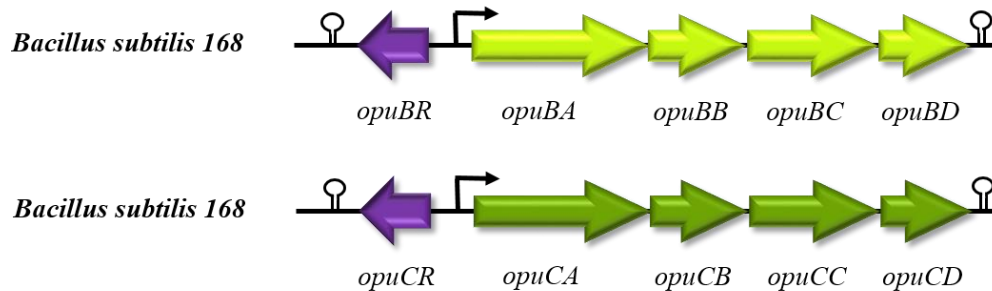


Abbildung 8: Die beiden Genloki von *opuBR* (*yvaV*) und *opuCR* (*yvbF/opcR*) aus *B. subtilis*.

In weiteren Studien von Lee *et al.* (2013) konnte gezeigt werden, dass OpuCR ein negativer transkriptioneller Regulator ist, der die Expression des *opuC*-Operons durch Bindung der DNA steuert. In Abwesenheit von GbsR nimmt OpuCR zudem Einfluss auf die Genregulation des *opuB*-Operons. Bei der Regulation der beiden Operone ist OpuCR im Gegensatz zu GbsR nicht Cholin-sensitiv. Außerdem ist in Abwesenheit von Salz eine Repression des *opuB*-Operons durch OpuCR nur in Abwesenheit von GbsR vorhanden (Lee *et al.*, 2013; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Der putative homologe Regulator OpuBR, der eine Aminosäuresequenzidentität von 77,8 % zu OpuCR aufweist, scheint allerdings weder einen Effekt auf die Genexpression des *opuB*-Operons, noch auf die des *opuC*-Operons zu haben (Lee *et al.*, 2013). Seine mögliche genetische Rolle ist daher noch völlig unverständlich.

Das DNA Bindemotiv von OpuCR vor *opuBA* und *opuCA* konnte bereits experimentell in EMSA Studien ermittelt werden (Lee *et al.*, 2013). Die genaue Lage ist Abbildung 9 zu entnehmen. Die vor *opuBA* und *opuCA* identischen Palindrome (mit Ausnahme eines Basenpaares) umschließen jeweils die -35 Region der SigA-Promotoren (Lee *et al.*, 2013). OpuCR macht demnach eine Okklusion für die RNA-Polymerase. Auch die von Leyn *et al.* (2013) für OpuCR und OpuBR bioinformatisch ermittelte DNA Binderegion liegt genau in diesem Bereich. Die Region beginnt und endet lediglich einige Basenpaare stromabwärts. Im Vergleich der beiden Palindrome unterscheiden sich die Bereiche vor *opuBA* und *opuCA* in lediglich zwei Basenpaaren voneinander (Abbildung 9).

Ein weiteres Bindemotiv konnte vor den beiden Operonen *opuB* und *opuC* ermittelt werden. Dabei handelt es sich um das Bindemotiv des Aktivators RemA ("regulator of extracellular matrix genes"). Es befindet sich noch weiter stromaufwärts des OpuCR Bindemotivs

(Abbildung 9). RemA sorgt durch die Bindung der DNA für die Expression der Operone, wenn die Zelle osmotischem Stress ausgesetzt ist. (Lee *et al.*, 2013; Winkelman *et al.*, 2013; Hoffmann, unveröffentlicht). Über RemA ist bereits seit Längerem bekannt, dass er an der Genregulation der Biofilmbildung von *B. subtilis* beteiligt ist (Blair *et al.*, 2008; Winkelman *et al.*, 2009). Dass RemA nicht nur die Genexpression von Biofilmgene aktiviert, sondern auch die von osmotisch-abhängigen Genen, konnte erst kürzlich in einem Microarray gezeigt werden (Winkelman *et al.*, 2013).

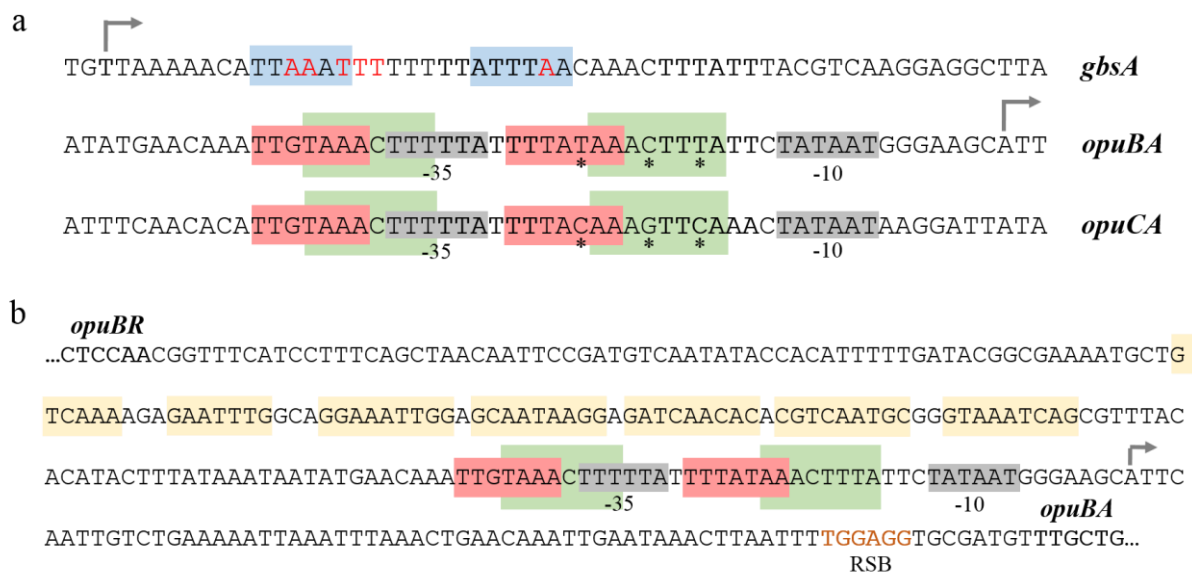


Abbildung 9: DNA Bindemotiv von OpuCR und OpuBR vor opuBA und opuCA.

Dargestellt sind drei Sequenzausschnitte vor opuBA, opuCA bzw. gbsA (a). In grau hinterlegt sind jeweils die -10 und die -35 Regionen der SigA-Promotoren. Die hellgrauen Pfeile zeigen den Transkriptionsstart der mRNA für das opuB- und das gbsAB-Operon an. Die rosa markierte Region ist das OpuCR Bindemotiv (Lee *et al.*, 2013), das sich lediglich in einer Base (*) unterscheidet. Die grün unterlegten Bereiche unter den Sequenzen zeigen das bioinformatisch ermittelte Bindemotiv für OpuCR und OpuBR nach Leyn *et al.* (2013) an. Es unterscheidet sich in zwei Basen (*) zwischen den beiden Promotorbereichen opuBA und opuCA. Die Sequenz vor gbsA, in der auch das GbsR Bindemotiv (blau hinterlegt) zu finden ist, unterscheidet sich deutlich (rote Basen) im Bereich der palindromischen Regionen des OpuBR bzw. OpuCR Bindemotivs. (b) stellt exemplarisch die gesamte intergene Region zwischen opuBR und opuBA dar. In gelb eingezeichnet ist das Bindemotiv von RemA (mündliche Überlieferung von Bremer, E. & Hoffmann T.).

Neben OpuBR und OpuCR aus *B. subtilis* ist noch ein weiterer GbsR-Typ Regulator untersucht, dessen Gen neben einem ABC-Transporter liegt. Es handelt sich hierbei um OpuAR aus dem marinen *Bacillus infantis* NRRL B-14911 (Henkel, 2010; Siefert *et al.*, 2000). Wie alle bisher erwähnten gbsR ähnlichen Gene, ist auch opuAR entgegen des angrenzenden putativen Operons orientiert (Abbildung 10).

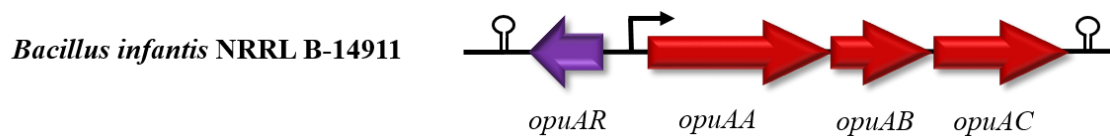


Abbildung 10: Genomische Lage des *opuAR* aus *B. infantis* NRRL B-14911.

Die drei angrenzenden Gene *opuAA*, *opuAB* und *opuAC* kodieren für einen OpuA-Typ Transporter, wie er aus *B. subtilis* bekannt ist (Arnhold, 2011; Henkel, 2010; Kempf & Bremer, 1995). Wie zuvor bioinformatisch vorhergesagt (Henkel, 2010), konnte Arnhold (2011) im Rahmen seiner Masterarbeit bestätigen, dass OpuA aus *B. infantis* NRRL B-14911 ein Transporter für kompatible Solute ist, der das gleiche Substratspektrum besitzt wie OpuA aus *B. subtilis*. Über die genaue Regulation des putativen *opuA*-Operons in *B. infantis* NRRL B-14911 ist bisher nichts bekannt.

In *B. subtilis* ist neben dem *opuA*-Operon kein *gbsR* ähnliches Gen zu finden. Hier ist die Expression des *opuA*-Operons in Anwesenheit von Salz hochreguliert (Kempf & Bremer, 1995). Liegt Glycin Betain unter osmolaren Bedingungen in der Umgebung vor, werden die Gene in *B. subtilis* wiederum reprimiert (Hoffmann *et al.*, 2013). Winkelmann *et al.* (2013) konnte zudem zeigen, dass für die Expression der Gene in *B. subtilis* der Aktivator RemA benötigt wird. Dieser bindet in der Promotorregion vor *opuAA* und aktiviert so die Expression der Gene.

Der putative GbsR-Typ Regulator OpuAR (180 AS) wurde bereits näher analysiert. Zu GbsR aus *B. subtilis* weist OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 eine Aminosäuresequenzidentität von 34 % auf. Genau wie GbsR ist auch OpuAR in der Lage Cholin (mit einer K_D von 232 \pm 25 μ M) zu binden (Henkel, 2010; Ziegler, 2009). Wie auch für GbsR konnte zunächst anhand eines Kristallstrukturmodells von OpuAR eine putative Ligandenbindestelle in der Linkerregion des Proteins gefunden werden. Analog zu den vier Phenylalaninen in GbsR aus *B. subtilis* befinden sich an diesen Positionen bei OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 folgende Aminosäuren: Y⁹⁴, F⁹⁷, R¹⁰⁰ und F¹⁰¹. Dass diese Aminosäuren tatsächlich an der Bindung des Liganden Cholin beteiligt sind, konnte durch OpuAR-Mutanten gezeigt werden (Henkel, 2010). Hierbei wurde die Bindungsaffinität zu Cholin u. a. einer OpuAR Doppelmutante, bei der die Aminosäuren Y⁹⁴ und R¹⁰⁰ zu jeweils einem Phenylalanin mutiert wurde, mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmt. Es wurde festgestellt, dass die Bindung mit einer K_D von 35 \pm 6 μ M durch den Austausch der nicht aromatischen Aminosäure Arginin in den Aromaten Phenylalanin eine deutliche Steigerung der Bindungsaffinität erzeugt (Henkel, 2010). Dadurch zeichnet sich ab, dass die Bindung von Cholin an OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 vermutlich über Kation- π Interaktion erfolgt. Da die Aromaten der Bindetasche von

OpuAR so verändert wurden, dass der putative "aromatic cage" wie bei GbsR aus *B. subtilis* vorliegt, ist eine Kation- π Interaktion mit dem Liganden Cholin für GbsR ebenfalls wahrscheinlich (Dougherty, 1996; Henkel, 2010).

Auch OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 besitzt laut bioinformatischen Analysen ein für MarR-Typ Regulatoren typisches Winged-Helix-Motiv im N-terminalen Bereich (Henkel, 2010; Wilkinson & Grove, 2006). Dieses 21 Aminosäure lange Winged-Helix-Motiv von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 zeigt im Vergleich mit dem von GbsR aus *B. subtilis* eine 76,19 %ige Sequenzidentität (Henkel, 2010). Ein DNA Bindemotiv vor *opuAA*, an das OpuAR mit seinem vorhergesagten Winged-Helix-Motiv binden könnte, ist bisher allerdings nicht bekannt. Vorstellbar ist aber, dass OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 ebenfalls ein transkriptioneller Regulator der Genexpression des benachbarten Genclusters ist, genau wie es bisher für GbsR und OpuCR aus *B. subtilis* beschrieben wurde (Lee *et al.*, 2013; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Da auch die Bindung von Cholin an OpuAR *in vitro* nachgewiesen werden konnte, spielt Cholin vermutlich als Induktor eine wichtige Rolle, so wie es bei der Regulation durch GbsR gezeigt werden konnte (Nau-Wagner *et al.*, 2012).

2.7 Das marine Bakterium *Bacillus infantis* NRRL B-14911

B. infantis NRRL B-14911 (einst *Bacillus sp.* NRRL B-14911) ist ein Gram-positives Stäbchen, dessen Genom bereits vollständig sequenziert wurde. *B. infantis* NRRL B-14911 konnte im Golf von Mexico aus 10 Meter Tiefe isoliert werden. Das Bakterium wächst aerob, bildet Sporen und weist eine rosa Pigmentierung auf. *B. infantis* NRRL B-14911 kann minimal bei 20°C und maximal bei 40°C wachsen (Siefert *et al.*, 2000). Das Wachstumsoptimum liegt bei 37°C (Alcaraz *et al.*, 2008). Das Bakterium verträgt Salzkonzentrationen bis zu 5 % (0,8 M). Laut dem von Alcaraz *et al.* (2008) durchgeführten Genomvergleich besitzt *B. infantis* NRRL B-14911 eine partielle Auxotrophie für Prolin und Methionin. Drei nahe Verwandte des *B. infantis* NRRL B-14911 sind *Bacillus firmus*, *Bacillus lentus* und *Bacillus megaterium* (Siefert *et al.*, 2000). *B. megaterium* gehört dabei zu einer Gruppe der *Bacilli*, die in der Lage sind, unter hochosmolaren Bedingungen Prolin und Glutamat als kompatible Solute selbst zu synthetisieren (Bursy *et al.*, 2007; Kuhlmann & Bremer, 2002).

Arnhold (2011) konnte zeigen, dass *B. infantis* NRRL B-14911 einen OpuA-Typ Transporter besitzt. Wie der OpuA Transporter selbst aus *B. subtilis*, ist auch der OpuA-Typ Transporter aus *B. infantis* NRRL B-14911 in der Lage die kompatiblen Solute DMG, DMSP, Glycin Betain, Homobetain und Prolin Betain aufzunehmen (Arnhold, 2011; Bashir *et al.*, 2014a; Broy

et al., 2015; Holtmann & Bremer, 2004; Horn *et al.*, 2005; Kempf & Bremer, 1995; Smits *et al.*, 2008). Ob *B. infantis* NRRL B-14911 diese kompatiblen Solute aufnimmt, um sie unter osmotischem Stress als Osmoprotektiva zu nutzen, ist bisher ungeklärt. Möglicherweise nutzt *B. infantis* NRRL B-14911 die kompatiblen Solute auch als Kohlen- oder Stickstoffquelle.

2.8 Zielsetzung

Der Cholin-sensitive Repressor GbsR reguliert die kodierenden Gene des Cholin-spezifischen Transporters OpuB und die der Glycin Betain Synthese in *B. subtilis*. Durch diesen bereits näher erforschten Regulator GbsR aus *B. subtilis* ist man auf eine neue Klasse von MarR-Typ Regulatoren aufmerksam geworden. Die Familie der GbsR-Typ Regulatoren soll im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert werden. Dazu soll die taxonomische Verbreitung der GbsR-Typ Regulatoren näher untersucht werden. Neben bioinformatischen Analysen sollen molekular genetische Methoden zur Charakterisierung des Bindemotivs von GbsR-Typ Regulatoren durchgeführt werden. Zudem soll die Ligandenbindetasche der GbsR-Typ Regulatoren, in der kompatible Solute gebunden werden, genauer untersucht werden.

Speziell das *opu* Regulon des marinen *B. infantis* NRRL B-14911 soll analysiert werden. Im Regulon enthalten ist ein OpuA-Typ Transporter, der kompatible Solute in das marine Bakterium transportieren kann. Es soll geklärt werden, ob *B. infantis* NRRL B-14911 die kompatiblen Solute als C-Quelle oder als Osmoprotektivum nutzt.

3. Material & Methoden

3.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien, Chemikalien, Enzyme und Medien werden im Folgenden aufgeführt.

3.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Expedeon (San Diego, USA), Fluka (Neu-Ulm, D), Life Technologies (Carlsbad, USA), Merck (Darmstadt, D), Roche (Mannheim, D), Roth (Karlsruhe, D) und Sigma-Aldrich (Steinheim, D) bezogen.

3.1.2 Enzyme und Oligonukleotide

Die verwendeten Restriktionsenzyme, Polymerasen und Ligasen stammen von den Firmen Roche (Mannheim, D) und Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim, D) oder Microsynth (Lindau, D) synthetisiert. Im Folgenden sind die Oligonukleotide für Klonierungen, Mutagenesen, Sequenzierungen, FusionsPCRs und für die EMSA Studien in Tabelle 1 zu finden.

Tabelle 1: Alle verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Bemerkung
Sequenzierungsprimer:		
pASG IBA for	GAGTTATTTTACCAC TC	Primer zur Sequenzierung des Inserts im Plasmid pASG-IBA3 und pASG- IBA5
pJMB1-pFSB1-for	ATAAGGGTAACTAT TGCCG	Primer zur Sequenzierung des Inserts in der MCS des Plasmids pJMB1
pJMB1-treA-rev	ACCATTTCTGTCGT ATCG	Primer zur Sequenzierung des Inserts in der MCS des Plasmids pJMB1
pMal-C2 Seq for	GGTCGTCAGACTGT CGATGAAGCC	Primer zur Sequenzierung des Inserts in der MCS des Plasmids pMal-C2
pMal-C2 Seq rev	CATCCGCCAAAACA GCCAAG	Primer zur Sequenzierung des Inserts in der MCS des Plasmids pMal-C2
pPT7 for	GAAATTAATACGAC TCACTATAG	Primer zur Sequenzierung des Inserts in der MCS des Plasmids pPT7

Klonierungsprimer:		
gbsR_B.sub_IBA3_for	AAGCTCTTCAATGG ATGAAAATCCAGAA TTTGCAGCT	Klonierungsprimer für <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> JH642 in pENTRY; am Primer angehängt ist die Stargate®-Klonierungssequenz; Resultat sind die Plasmide pSTH01 & pSTH02;
gbsR_B.sub_IBA3_rev	AAGCTCTTCACCCCT TTGTTTCGACCGGTA TAAATTTAAAA	siehe gbsR_B.sub_IBA3_for
OpuAR TreA Frag1/2 rev	AAAGGATCCCTGAA GCAGCTTCGATTGT GAC	Primer zur Amplifizierung der <i>treA</i> -Fusionsfragmente für die Plasmide pSTH33 und pSTH34; enthält eine BamHI Schnittstelle
OpuAR TreA Frag1/4 for	AAACCCGGGGCACC TTTTTGGAGAGCATC TAC	Primer zur Amplifizierung der <i>treA</i> -Fusionsfragmente für die Plasmide pSTH33 und pSTH36; enthält eine SmaI Schnittstelle
OpuAR TreA Frag2 for	AAACCCGGGGAACT CCGTATAAATGCAT GTTTC	Primer zur Amplifizierung des <i>treA</i> -Fusionsfragments für das Plasmid pSTH34; enthält eine SmaI Schnittstelle
OpuAR TreA Frag3/4 rev	AAAGGATCCCACCT CTAAACTTTGTTTAT ACATG	Primer zur Amplifizierung der <i>treA</i> -Fusionsfragmente für die Plasmide pSTH35 und pSTH36; enthält eine BamHI Schnittstelle
OpuAR TreA Frag3 for	AAACCCGGGGATTT ATAGGTTTGTTGTAT GCAAC	Primer zur Amplifizierung des <i>treA</i> -Fusionsfragments für das Plasmid pSTH35; enthält eine SmaI Schnittstelle
MAL-C2 GbsR for	AAAGAATTCATGGA TGAAAATCCAGAAT TTGC	Klonierungsprimer für <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> JH642 in pMAL-C2, in den mit einer EcoRI Schnittstelle kloniert wurde; Resultat ist das Plasmid pSTH47
MAL-C2 GbsR rev	AAAGGATCCGTTTC CCAGGCGTTTTCTGC T	Klonierungsprimer für <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> JH642 in pMAL-C2, in den mit einer BamHI Schnittstelle kloniert wurde; dieser Primer bindet 21 bp hinter dem Stopcodon; Resultat ist das Plasmid pSTH47
3STOP1623hp GbsR for	AAAAC TAGTATGGA TGAAAATCCAGAAT TTGC	Klonierungsprimer für <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> JH642 mit C-terminalem Strep-Tag®II in pPT7, in den mit einer SpeI Schnittstelle kloniert wurde; Resultat ist das Plasmid pSTH55
3STOP1623hp GbsR rev	AAAGAGCTCTTATTT TTCGAACTGCGGGT G	Klonierungsprimer für <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> JH642 mit C-terminalem Strep-Tag®II in pPT7, in den mit einer SacI Schnittstelle kloniert wurde; Resultat ist das Plasmid pSTH55

Mutageneseprimer:

OpuAR_N98Fn_for	GTACAAAAGCGATC GATGAAAAAAGTGGT ACCAATCCCCTTTGAC	Primer zur Mutagenese des Plasmids pMP_AR1. Die Mutation wird im <i>opuAR</i> des Stammes <i>B. infantis</i> NRRL B-14911 durchgeführt (AAT → TTT) und führt zu folgendem AS-Austausch N ⁹⁸ F; Resultat ist das Plasmid pSTH49
OpuAR_N98Fn_rev	TCAAAGGGGATTGG TACCAGTTTTTCATC GATCGCTTTTGTAC	Primer zur Mutagenese des Plasmids pMP_AR1. Die Mutation wird im <i>opuAR</i> des Stammes <i>B. infantis</i> NRRL B-14911 durchgeführt (AAT → TTT) und führt zu folgendem AS-Austausch N ⁹⁸ F; Resultat ist das Plasmid pSTH49
OpuAR_W95F_for	GATTTATACCAGGT CAAAGGGGATTCT ACCAGAATTTTCATC GATCG	Primer zur Mutagenese des Plasmids pMP_AR1. Die Mutation wird im <i>opuAR</i> des Stammes <i>B. infantis</i> NRRL B-14911 durchgeführt (TGG → TCT) und führt zu folgendem AS-Austausch W ⁹⁵ F; Resultat ist das Plasmid pSTH50
OpuAR_W95F_rev	CGATCGATGAAATT CTGGTAGAAATCCC CTTTGACCTGGTATA AATC	Primer zur Mutagenese des Plasmids pMP_AR1. Die Mutation wird im <i>opuAR</i> des Stammes <i>B. infantis</i> NRRL B-14911 durchgeführt (TGG → TCT) und führt zu folgendem AS-Austausch W ⁹⁵ F; Resultat ist das Plasmid pSTH50
OpuARbind_mut1 for	GTACTTTATTGATGG AATTTGATG	Primer zur Mutagenese der Plasmide pSTH33 und pSTH34. Resultat sind die Plasmide pSTH72, 74, 75 und 77. Die genaue Deletion der intergenen Region kann Tabelle 13 entnommen werden
OpuARbind_mut1 rev	GTACTAAATTATCTT ATTCTTAGATTTC	Primer zur Mutagenese der Plasmide pSTH33 und pSTH34. Resultat sind die Plasmide pSTH72, 73, 75 und 76. Die genaue Deletion der intergenen Region kann Tabelle 13 entnommen werden
OpuARbind_mut2 for	TTCAAAGTGTACGT ACTTTATTG	Primer zur Mutagenese der Plasmide pSTH33 und pSTH34. Resultat sind die Plasmide pSTH73 und pSTH76. Die genaue Deletion der intergenen Region kann Tabelle 13 entnommen werden
OpuARbind_mut3 rev	TTTGAAGTGTACGTA CTAAATTATC	Primer zur Mutagenese der Plasmide pSTH33 und pSTH34. Resultat sind die Plasmide pSTH74 und pSTH77. Die genaue Deletion der intergenen

		Region kann Tabelle 13 entnommen werden
Fusions PCR Primer:		
OpuBR Knout P1	GATAAATTCCTCAA CAAATTCGTCTGCC	Primer zu Amplifizierung der 5' Flanke der <i>opuBR</i> Deletionsmutante
OpuBR Knout Tet P2	CCGTAATGCTATGTT AGCATTACTCTTTTC CATGTTTTCCGCGAT TCTTTCTATAAAATG	Primer zu Amplifizierung der 5' Flanke der <i>opuBR</i> Deletionsmutante
OpuBR Kneu2 Tet P3	AAATTGTTATCCGCT CACAATTCCACACA ACATATTTGAGAGC GAAGACATTTTAA ATATGTG	Primer zu Amplifizierung der 3' Flanke der <i>opuBR</i> Deletionsmutante
OpuBR Knout P4	CAGTGAAATAAACC GGTAAATCTAGGTC TC	Primer zu Amplifizierung der 3' Flanke der <i>opuBR</i> Deletionsmutante
OpuBR Knout Tet P5	CATTTTATAGAAAG AATCGCGGAAAACA TGGAAAAGAGTAAT GCTAACATAGCATT ACGG	Primer zu Amplifizierung der Tetracyclinkassette der <i>opuBR</i> Deletionsmutante
OpuBR Kneu2 Tet P6	CACATATTTAAAAA TGTCTTCGCTCTCAA ATATGTTGTGTGGA ATTGTGAGCGGATA ACAATTT	Primer zu Amplifizierung der Tetracyclinkassette der <i>opuBR</i> Deletionsmutante
OpuCR Knout P1	ATAAATTCTTCAAC AAACTCATTTGCCG G	Primer zu Amplifizierung der 5' Flanke der <i>opuCR</i> Deletionsmutante
OpuCR Knout Zeo P2	CCATACAAGATAAC TTCGTATAATGTATG TTGAAGGCATTCCA AACGTATGCATATTT T	Primer zu Amplifizierung der 5' Flanke der <i>opuCR</i> Deletionsmutante
OpuCR Knout Zeo P3	GGACTGAATAACTT CGTATAGCATACAT TAGAAAACAAAAGA ATGCAGCTCTCTAA AATA	Primer zu Amplifizierung der 3' Flanke der <i>opuCR</i> Deletionsmutante
OpuCR Knout P4	GTAAAGCAATACTC GTCTGCTTTTGTTTT A	Primer zu Amplifizierung der 3' Flanke der <i>opuCR</i> Deletionsmutante
OpuCR Knout Zeo P5	AAAATATGCATACG TTTGGAATGCCTTCA ACATACATTATACG AAGTTATCTTGATAT GG	Primer zu Amplifizierung der Zeocinkassette der <i>opuCR</i> Deletionsmutante

OpuCR Knout Zeo P6	TATTTTAGAGAGCT GCATTCTTTTGT CTAATGTATGCTATA CGAAGTTATTTCAGT CC	Primer zu Amplifizierung der Zeocinkassette der <i>opuCR</i> Deletionsmutante
Primer für Electrophoretic mobility shift assay (EMSA):		
BS GbsR-GbsA for	GGGACTTTGACAGT TTAAAAACC	EMSA-Primer des 96 bp Fragments vor <i>gbsA</i> in <i>B. subtilis</i> ; Primer trägt am 5' Ende eine Cy5 Markierung
BS GbsR-GbsA rev	ATAAGCCTCCTTGA CGTAAATAA	EMSA-Primer des 96 bp Fragments vor <i>gbsA</i> in <i>B. subtilis</i> ; Primer trägt am 5' Ende eine Cy5 Markierung
BS Kfragm for	CTTGCTTGTTGAGGA TGCCATTC	EMSA-Primer des 98 bp Kontrollfragments im <i>gbsA</i> in <i>B. subtilis</i> ; Primer trägt am 5' Ende eine Cy5 Markierung
BS Kfragm rev	CTGTCTCAGCATGA AAACCGTTTC	EMSA-Primer des 98 bp Kontrollfragments im <i>gbsA</i> in <i>B. subtilis</i> ; Primer trägt am 5' Ende eine Cy5 Markierung
BS opuAR-opuAA rev	CACCTCTAAACTTTG TTTATACATG	EMSA-Primer des 301 bp Fragments zwischen <i>opuAR</i> und <i>opuAA</i> in <i>B. infantis</i> NRRL B-14911; Primer trägt am 5' Ende eine Cy5 Markierung
BS opuAR-opuAA gr for	CACCACCATTCTAGT CACAAATG	EMSA-Primer des 301 bp Fragments zwischen <i>opuAR</i> und <i>opuAA</i> in <i>B. infantis</i> NRRL B-14911; Primer trägt am 5' Ende eine Cy5 Markierung
BS opuAA Kfrag for	CATGCAGACAGAAG GCAATGGAG	EMSA-Primer des 105 bp Kontrollfragments im <i>opuAA</i> in <i>B. infantis</i> NRRL B-14911; Primer trägt am 5' Ende eine Cy5 Markierung
BS opuAA Kfrag rev	GGCCTACACGCTGC TGCATAC	EMSA-Primer des 105 bp Kontrollfragments im <i>opuAA</i> in <i>B. infantis</i> NRRL B-14911; Primer trägt am 5' Ende eine Cy5 Markierung
CudC2_for	ctcgtttgacacccttcaattac	EMSA-Primer des 94 bp Fragments vor <i>cudA</i> in <i>S. xylosus</i> C2A; Primer trägt am 5' Ende eine Cy5 Markierung
CudC_rev	cattaaaattacctccgtaagtgtg	EMSA-Primer des 94 bp Fragments vor <i>cudA</i> in <i>S. xylosus</i> C2A; Primer trägt am 5' Ende eine Cy5 Markierung
CudT2_for	gttcgtaggetcatgtttgtg	EMSA-Primer des 101 bp Fragments vor <i>cudT</i> in <i>S. xylosus</i> C2A; Primer trägt am 5' Ende eine Cy5 Markierung
CudT_rev	gaacaccctgaatttagatttc	EMSA-Primer des 101 bp Fragments vor <i>cudT</i> in <i>S. xylosus</i> C2A; Primer trägt am 5' Ende eine Cy5 Markierung
CudA_for	gaagccgagtgaattactccg	EMSA-Primer des 107 bp Kontrollfragments im <i>cudA</i> in

		<i>S. xylosus</i> C2A; Primer trägt am 5' Ende eine Cy5 Markierung
CudA_rev	ctgagcctttacctagtacaag	EMSA-Primer des 107 bp Kontrollfragments im <i>cudA</i> in <i>S. xylosus</i> C2A; Primer trägt am 5' Ende eine Cy5 Markierung

3.1.3 Medien

Als Komplexmedium für *E. coli*, *B. subtilis* und *B. infantis* wurde LB-Medium (Luria-Bertaini Broth, Tabelle 2) verwendet (Miller, 1992). Festmedien wurden mit 15 g/L Agar versetzt.

Als Minimalmedium für die Bakterienstämme *E. coli* BL21 und ArcticExpress (DE3) RIL wurde bei der heterologen Expression von Proteinen Minimalmedium A (MMA; Tabelle 3) verwendet (Sambrook & Russell, 2001). Zum Medium wurde zusätzlich 0,4 % Glucose sowie 0,4 % Casaminoäuren, 1 mM MgSO₄ und Thiamin zugegeben.

Für die Kultivierung von *B. subtilis* in Minimalmedium wurde Spizizen's Minimalmedium (SMM; Tabelle 4) genutzt (Spizizen, 1958). Dem SMM wurden zusätzlich Spurenelemente (Tabelle 5) und 0,5 % Glucose beifügt (Harwood & Cutting, 1990). Zur Komplettierung der Tryptophan und Phenylalanin Auxotrophien des Stammes *B. subtilis* JH642 (Tabelle 9) wurden dem Minimalmedium L-Tryptophan (20 mg/L) und L-Phenylalanin (18 mg/L) beifügt. *B. infantis* NRRL B-14911 wurde in Basalmedium (BM, Tabelle 6) als Minimalmedium kultiviert (González *et al.*, 1997). Falls nicht anders beschrieben, wurden diesem Medium 0,4 % Casaminoäuren zugegeben. Den Minimalmedien wurde bei der Untersuchung unter hochosmolaren Bedingungen entsprechend der gewünschten Salzkonzentration 5M NaCl beifügt. Die Medien wurden nach dem Abkühlen je nach Bedarf mit verschiedenen Antibiotika, kompatiblen Soluten und anderen Medienzusätzen vermischt. Die Substanzen wurden, wie in Tabelle 7 aufgelistet, hergestellt.

Tabelle 2: Komplexmedium LB-Medium

Komponenten	Zusammensetzung pro Liter
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g

Tabelle 3: Minimalmedium A (MMA)

Komponenten	Zusammensetzung pro Liter
Na ₂ HPO ₄	10,5 g
KH ₂ PO ₄	4,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
Na ₃ Citrat	0,5 g

Tabelle 4: 5x Spizizen's Minimal Medium (5xSMM)

Komponenten	Zusammensetzung pro Liter
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
K ₂ HPO ₄	70 g
KH ₂ PO ₄	30 g
Na ₃ Citrat x 2H ₂ O	5 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1 g

Tabelle 5: 100x Spurenelemente

Komponenten	Zusammensetzung pro Liter
CaCl ₂	0,55 g
FeCl ₃ x 6H ₂ O	1,35 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,1 g
ZnCl ₂	0,17 g
CuCl ₂ x 6H ₂ O	0,05 g
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,06 g
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,06 g

Tabelle 6: Basalmedium

Komponenten	Konzentration im Medium
MgSO ₄ * 7H ₂ O	50 mM
KCl	10 mM
CaCl ₂ * 2H ₂ O	10 mM
NH ₄ Cl	190 mM
K ₂ HPO ₄	0,33 mM
FeSO ₄ * 7H ₂ O	0,1 mM
MOPS Puffer pH 7,5	50 mM
Vitamin A Lösung ^a	1x
Vitamin B Lösung ^b	1x
Glucose	27,7 mM

^aVitamin A Lösung 200x (Biotin 7,8 mg/L, Nicotinsäure 15,6 mg/L, Liponsäure 15,6 mg/L in H₂O gelöst, pH 7,5)

^bVitamin B Lösung 200x (Pantothnat 15,6 mg/L, Pyridoxin B6 15,6 mg/L, Thiamin 15,6 mg/L, 4-Aminobenzoessäure 15,6 mg/L, Cabalamin 0,32 mg/L in H₂O gelöst)

Tabelle 7: Antibiotika, kompatible Solute und andere Medienzusätze

Komponenten	Konzentration im Medium
Ampicillin	100 µg/ml
Gentamycin	20 µg/ml
Kanamycin (für <i>E. coli</i>)	50 µg/ml
Kanamycin (für <i>B. subtilis</i>)	5 µg/ml
Tetracyclin	10 µg/ml (in 70 % EtOH gelöst)
Zeocin	35 µg/ml
Chloramphenicol	5 µg/ml (in 70 % EtOH gelöst)
Erythromycin	1 µg/ml (in 70 % EtOH gelöst)
Anhydrotetracyclin	0,2 µg/ml (in DMF gelöst)
X-Gal	25 µg/ml (in DMF gelöst)
Thiamin	1 µg/ml
Cholin	1 mM
Cholin-O-Sulfat (COS)	1 mM
Dimethylglycin (DMG)	1 mM
Dimethylsulfoniumpropionat (DSMP)	1 mM
Ectoin	1 mM
Glycin Betain (GB)	1 mM
Homobetain (HB)	1 mM
Prolin	1 mM
Prolin Betain (PB)	1 mM

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Alle verwendeten Bakterienstämme sind im Folgenden aufgelistet. Dabei sind *E. coli*-Stämme zur Klonierung oder Produktion in Tabelle 8 zu finden. Tabelle 9 enthält alle genutzten und neu angefertigten *Bacillus*-Stämme. Die Plasmide sind in Tabelle 10 zu finden.

Tabelle 8: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α	F ⁻ λ ⁻ E44 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 Φ80d <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) <i>recA1 endA thi-1 relA1 gyrA96</i>	Hanahan, 1983
BL21	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal endA</i>	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
ArcticExpress (DE3) RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte [<i>cpn10 cpn60</i> Gent ^r] [<i>argU ileY leuW</i> Str ^r]	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Tabelle 9: Verwendete *Bacillus*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>B. infantis</i> NRRL B-14911	Wildtyp; marines Isolat (Siefert <i>et al.</i> , 2000)	BGSC ^a , 29A3
<i>Bacillus megaterium</i>:		
MS941	DSM319, $\Delta nprM$	Gamer <i>et al.</i> , 2009
<i>Bacillus subtilis</i> Stämme:		
JH642	<i>trpC2 pheA1 appA</i> -168	J. Hoch; BGSC, 1A96
GNB37	$\Delta(treA::erm)2$	Nau-Wagner <i>et al.</i> , 2012
GNB40	$\Delta(treA::erm)2(gbsR::neo)1$	Nau-Wagner <i>et al.</i> , 2012
CAB1	$(\Delta opuAABC::tet)3 (\Delta opuCABCD::spc)3 (\Delta opuD::kan)2 (\Delta opuBA-BD::ery)3 \Delta(amyE::pX, cml)$	Arnhold, 2011
CAB2	$(\Delta opuAABC::tet)3 (\Delta opuCABCD::spc)3 (\Delta opuD::kan)2 (\Delta opuBA-BD::ery)3 \Delta(amyE::pCA-opuAR-opuA, cml)$	Arnhold, 2011
DHB4	$\Delta(treA::erm)2 \Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{p_{DH2}}-treA), cml]1$	Nau-Wagner <i>et al.</i> , 2012
DHB12	$\Delta(treA::erm)2 (gbsR::neo)1 \Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{p_{DH2}}-treA), cml]1$	Nau-Wagner <i>et al.</i> , 2012
AROB5	$\Delta(treA::erm)2 \Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{p_{ARO15}}-treA), cml]9$	Rolbetzki, A.; unveröffentlicht
AROB10	$\Delta(treA::erm)2 (gbsR::neo)1 \Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{p_{ARO15}}-treA), cml]9$	Rolbetzki, A.; unveröffentlicht
STHB04	$\Delta(treA::erm)2 (gbsR::neo)1 \Delta(opuBR::tet)2$	diese Arbeit
STHB05	$\Delta(treA::erm)2 (gbsR::neo)1 \Delta(opuBR::tet)2 \Delta(opuCR::zeo)2$	diese Arbeit
STHB06	$\Delta(treA::erm)2 (gbsR::neo)1 \Delta(opuCR::zeo)2$	diese Arbeit
STHB07	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(opuBR::tet)2 \Delta(opuCR::zeo)2$	diese Arbeit
STHB10	$\Delta(treA::erm)2 (gbsR::neo)1 \Delta(opuBR::Tet)2 \Delta(opuCR::zeo)2 \Delta[amyE::\Phi(opuAA'_{p_{STH33}}-treA), cml]1$	diese Arbeit
STHB11	$\Delta(treA::erm)2 (gbsR::neo)1 \Delta(opuBR::Tet)2 \Delta(opuCR::zeo)2 \Delta[amyE::\Phi(opuAA'_{p_{STH34}}-treA), cml]1$	diese Arbeit
STHB12	$\Delta(treA::erm)2 (gbsR::neo)1 \Delta(opuBR::Tet)2 \Delta(opuCR::zeo)2 \Delta[amyE::\Phi(opuAA'_{p_{STH35}}-treA), cml]1$	diese Arbeit
STHB13	$\Delta(treA::erm)2 (gbsR::neo)1 \Delta(opuBR::tet)2 \Delta[amyE::\Phi(opuAA'_{p_{STH36}}-treA), cml]1$	diese Arbeit
STHB65	$\Delta(treA::erm)2 (gbsR::neo)1 \Delta(opuBR::tet)2 \Delta[amyE::\Phi(opuAA'_{p_{STH34}}-treA), cml]1$	diese Arbeit
STHB66	$\Delta(treA::erm)2 (gbsR::neo)1 \Delta(opuCR::zeo)2 \Delta[amyE::\Phi(opuAA'_{p_{STH34}}-treA), cml]1$	diese Arbeit
STHB67	$\Delta(treA::erm)2 \Delta(opuBR::tet)1 \Delta(opuCR::zeo)2 \Delta[amyE::\Phi(opuAA'_{p_{STH34}}-treA), cml]1$	diese Arbeit

STHB68	$\Delta(treA::erm)2$ (<i>gbsR::neo</i>)1 $\Delta(opuBR::tet)2$ $\Delta(opuCR::zeo)2$ $\Delta[amyE::\Phi(opuAA'_{pSTH72-treA}), cml]2$	diese Arbeit
STHB69	$\Delta(treA::erm)2$ (<i>gbsR::neo</i>)1 $\Delta(opuBR::tet)2$ $\Delta(opuCR::zeo)2$ $\Delta[amyE::\Phi(opuAA'_{pSTH73-treA}), cml]3$	diese Arbeit
STHB70	$\Delta(treA::erm)2$ (<i>gbsR::neo</i>)1 $\Delta(opuBR::tet)2$ $\Delta(opuCR::zeo)2$ $\Delta[amyE::\Phi(opuAA'_{pSTH74-treA}), cml]4$	diese Arbeit
STHB71	$\Delta(treA::erm)2$ (<i>gbsR::neo</i>)1 $\Delta(opuBR::tet)2$ $\Delta(opuCR::zeo)2$ $\Delta[amyE::\Phi(opuAA'_{pSTH75-treA}), cml]2$	diese Arbeit
STHB72	$\Delta(treA::erm)2$ (<i>gbsR::neo</i>)1 $\Delta(opuBR::tet)2$ $\Delta(opuCR::zeo)2$ $\Delta[amyE::\Phi(opuAA'_{pSTH76-treA}), cml]3$	diese Arbeit
STHB73	$\Delta(treA::erm)2$ (<i>gbsR::neo</i>)1 $\Delta(opuBR::tet)2$ $\Delta(opuCR::zeo)2$ $\Delta[amyE::\Phi(opuAA'_{pSTH77-treA}), cml]4$	diese Arbeit
STHB78	$\Delta(treA::erm)2$ $\Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{pDH2\ 1.1-treA}), cml]2$	Schumann, 2015
STHB79	$\Delta(treA::erm)2$ $\Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{pDH2\ 2.1-treA}), cml]3$	Schumann, 2015
STHB80	$\Delta(treA::erm)2$ $\Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{pDH2\ 3.1-treA}), cml]4$	Schumann, 2015
STHB81	$\Delta(treA::erm)2$ $\Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{pDH2\ 4.1-treA}), cml]5$	Schumann, 2015
STHB82	$\Delta(treA::erm)2$ $\Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{pDH2\ 5.2-treA}), cml]6$	Schumann, 2015
STHB83	$\Delta(treA::erm)2$ $\Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{pDH2\ 6.5-treA}), cml]7$	Schumann, 2015
STHB84	$\Delta(treA::erm)2$ $\Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{pDH2\ 7.p-treA}), cml]8$	Schumann, 2015
STHB85	$\Delta(treA::erm)2$ (<i>gbsR::neo</i>)1 $\Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{pDH2\ 1.1-treA}), cml]2$	Schumann, 2015
STHB86	$\Delta(treA::erm)2$ (<i>gbsR::neo</i>)1 $\Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{pDH2\ 2.1-treA}), cml]3$	Schumann, 2015
STHB87	$\Delta(treA::erm)2$ (<i>gbsR::neo</i>)1 $\Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{pDH2\ 3.1-treA}), cml]4$	Schumann, 2015
STHB88	$\Delta(treA::erm)2$ (<i>gbsR::neo</i>)1 $\Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{pDH2\ 4.1-treA}), cml]5$	Schumann, 2015
STHB89	$\Delta(treA::erm)2$ (<i>gbsR::neo</i>)1 $\Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{pDH2\ 5.2-treA}), cml]6$	Schumann, 2015
STHB90	$\Delta(treA::erm)2$ (<i>gbsR::neo</i>)1 $\Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{pDH2\ 6.5-treA}), cml]7$	Schumann, 2015
STHB91	$\Delta(treA::erm)2$ (<i>gbsR::neo</i>)1 $\Delta[amyE::\Phi(gbsA'_{pDH2\ 7.p-treA}), cml]8$	Schumann, 2015

^aBacillus Genetic Stock Center

Tabelle 10: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pENTRY	Eintrittsvektor des StarGate®-Klonierungssystems von IBA; Kan ^r	IBA (Göttingen, D)
pASG-IBA3	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> mit AHT-induzierbarem <i>tet</i> -Promotor und C-terminalem Strep-Tag®II; Amp ^r	IBA (Göttingen, D)
pJMB1	Vektor mit promotorlosem <i>treA</i> -Reportergen und homologen Bereichen des <i>amyE</i> Genlokuses zur stabilen Integration in <i>B. subtilis</i> ; Amp ^r , Cml ^r	Jebbar, M. & Bremer, E.; unveröffentlicht
pRNAP-T7	Begleitvektor zum pPT7 zur Xylose-induzierten Produktion der T7-RNA-Polymerase in <i>B. megaterium</i> (P _{xyIA} -4xGGA- <i>rnap</i> -Stop); Amp ^r , Cml ^r	Gamer <i>et al.</i> , 2009

pPT7	Expressionsvektor für <i>B. megaterium</i> mit Xylose-induzierbarem Promotor (P _{xyIA} -MCS-Stop); Tet ^r , Amp ^r	Gamer <i>et al.</i> , 2009
pMAL-C2	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> mit IPTG-induzierbarem Promotor und N-terminalem Maltosebindeprotein als Fusionsprotein; Amp ^r	NEB (Massachusetts, USA)
pMP_AR1	pASK-IBA3plus mit <i>opuAR</i> aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911; Amp ^r	Ziegler, 2009
pSTH01	pENTRY mit <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> JH642 als Insert	diese Arbeit
pSTH02	pASG-IBA3 mit <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> JH642 als Insert	diese Arbeit
pSTH21	Plasmid der Firma GeneArt® Gene Synthesis mit dem für <i>E. coli</i> Codon-optimierten <i>cudC</i> aus <i>S. xylosus</i> C2A; Amp ^r	GeneArt® Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
pSTH22	pENTRY mit für <i>E. coli</i> Codon-optimiertem <i>cudC</i> aus <i>S. xylosus</i> C2A	diese Arbeit
pSTH23	pASG-IBA3 mit für <i>E. coli</i> Codon-optimiertem <i>cudC</i> aus <i>S. xylosus</i> C2A	diese Arbeit
pSTH33	pJMB1 mit 982 bp des <i>opuAA</i> , dem gesamten <i>opuAR</i> und der dazwischen liegenden intergenen Region aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911, fusioniert an das promotorlose <i>treA</i> ; kloniert wurde über BamHI und SmaI	diese Arbeit
pSTH34	pJMB1 mit 982 bp des <i>opuAA</i> , der intergenen Region und 82 bp des <i>opuARs</i> aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911, fusioniert an das promotorlose <i>treA</i> ; kloniert wurde über BamHI und SmaI	diese Arbeit
pSTH35	pJMB1 mit 109 bp der intergenen Region vor <i>opuAA</i> aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911, fusioniert an das promotorlose <i>treA</i> ; kloniert wurde über BamHI und SmaI	diese Arbeit
pSTH36	pJMB1 mit 306 bp der intergenen Region und dem gesamten <i>opuAR</i> aus <i>B. infantis</i> NRRL B-14911, fusioniert an das promotorlose <i>treA</i> ; kloniert wurde über BamHI und SmaI	diese Arbeit
pSTH47	pMAL-C2 mit <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> und zusätzlichen 21 bp nach dem Stopcodon; kloniert wurde über BamHI und EcoRI Schnittstelle	diese Arbeit
pSTH49	pMP_AR1 mutiert im Insert <i>opuAR</i> . Basenpaaraustausch (AAT → TTT) führt zum Austausch der AS W ⁹⁵ F	diese Arbeit
pSTH50	pMP_AR1 mutiert im Insert <i>opuAR</i> . Basenpaaraustausch (TGG → TCT) führt zum Austausch der AS N ⁹⁸ F	diese Arbeit
pSTH55	pPT7 mit <i>gbsR</i> aus <i>B. subtilis</i> JH642 als Insert. C-terminal wurden die Basensequenz für den Strep-Tag®II (SAWSHPQFEK) angehängen und das Stopcodon dahinter eingefügt; kloniert wurde über die Schnittstellen SpeI und SacI	diese Arbeit

pSTH72	pSTH33 mit Deletion der folgenden Basen GTACAGTTTTTACTGTAC in der intergenen Region	diese Arbeit
pSTH73	pSTH33 mit Deletion der folgenden Basen GTACAG in der intergenen Region	diese Arbeit
pSTH74	pSTH33 mit Deletion der folgenden Basen CTGTAC in der intergenen Region	diese Arbeit
pSTH75	pSTH34 mit Deletion der folgenden Basen GTACAGTTTTTACTGTAC in der intergenen Region	diese Arbeit
pSTH76	pSTH34 mit Deletion der folgenden Basen GTACAG in der intergenen Region	diese Arbeit
pSTH77	pSTH34 mit Deletion der folgenden Basen CTGTAC in der intergenen Region	diese Arbeit

3.2.2 Sterilisation

Alle hitzestabilen Medien wurden bei 121 °C für 60 Minuten und 1 bar Überdruck autoklaviert. Hitzeinstabile Substanzen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße, Carl Roth, D). Glaswaren wurden für 6 h bei 180 °C sterilisiert.

3.2.3 Kultivierung von Bakterien

Alle Kulturen wurden aerob bei 37 °C inkubiert. In einem Kulturvolumen von 10 – 1000 ml wurden die verschiedenen Bakterien in 100 – 2000 ml Erlenmeyerkolben schüttelnd bei 220 rpm kultiviert. Die Inkubation erfolgte entweder in einem Luftschüttler oder einem Wasserbad. Kleinere Volumina wurden in Reagenzgläsern auf dem Roller bebrütet. Festmedien wurden mit einer Glaspipette oder Glaskugeln ausplattiert und im Brutschrank (BD-115, WTC Binder, Tuttlingen, D) inkubiert.

3.2.4 Ermittlung der Zelldichte

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde photometrisch bestimmt. Dafür wurde die Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm (OD_{578}) in einem Spektralphotometer (Ultrospec 2100 pro, GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK) bestimmt. Bei einer OD von 1 beträgt die Zelldichte von *E. coli* $1 \cdot 10^9$ Zellen/ml (Sambrook & Russell, 2001).

3.3 Molekularbiologische und genetische Methoden

3.3.1 Präparation, Aufarbeitung und Klonierungsverfahren von DNA

Präparation chromosomaler DNA aus *B. subtilis*

Die Isolierung der chromosomalen DNA aus verschiedenen *B. subtilis*-Stämmen erfolgte nach Marmur (1961). Dafür wurden 5 ml LB Medium mit einer Kolonie des entsprechenden Stammes beimpft und für 3 h bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 13.000 rpm) und in Saline-EDTA (150 mM NaCl, 100 mM EDTA pH 8) resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl Lysozym (50 mg/ml) werden die Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation bei 60 °C nachdem zuvor 75 µl einer 20 % SDS Lösung zugegeben wurde. Dem Lysat wurde im Anschluss 120 µl 5 M Natriumperchlorat und 800 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1 v/v) beigelegt. Nun wurde die Probe für eine halbe Stunde stark geschüttelt und im Anschluss die Phasen durch Zentrifugation (10 min, 10.000 rpm) getrennt. Die oberste Phase wurde in ein neues Eppendorfcup überführt und die DNA mittels kaltem 95 % Ethanol und einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 13.000 rpm) gefällt. Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und letztlich in 100 µl destilliertem Wasser gelöst.

Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Plasmid DNA wurden in der Regel mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) aus *E. coli* Zellen isoliert. Dazu wurden bis zu 10 ml LB Kultur und dem entsprechenden Antibiotika mit einer Kolonie inokuliert und über Nacht inkubiert. Im folgenden Verfahren wurde sich an das Herstellerprotokoll gehalten.

Wurden größere Mengen Plasmid DNA benötigt, wurde auf das Plasmid Midi Kit von QIAGEN (Hilden, D) zurückgegriffen. Hierfür wurden die Kulturen in einem Volumen bis zu 500 ml angeimpft. Die Durchführung erfolgte wie im Herstellerprotokoll geschildert.

Mutagenese von Plasmid DNA

Plasmid DNA wurde mit Hilfe des Q5[®] Site Directed Mutagenesis Kit der Firma New England Biolabs (Massachusetts, USA) mutiert. Die verwendeten Primer wurden mit dem NEBaseChanger des Herstellers designt. Bei der Durchführung wurde sich an das Protokoll des Kit-Herstellers gehalten.

Agarosegelelektrophorese

Zur Größenauftrennung von DNA wurde ein 1 % Agarosegel verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanten 120 V für circa 40 min. Als Laufpuffer wurde 1xTAE-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8, 90 mM Borsäure und 1 mM EDTA) verwendet. Als Größenstandard wurde stets der MassRuler Mix von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) genutzt. Die DNA wurde vor dem Auftragen auf das Agarosegel mit dem dazugehörigen 6x Loading Dye vermischt. Nach dem Auftrennungsprozess wurde das Agarosegel für 10 min in eine Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) gelegt. Die gefärbte DNA wurde nun mittels eines UV-Durchlichts bei einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht.

Präparation von DNA aus Agarosegelen

Bei der Reinigung der DNA aus Agarosegelen wurde das gewünschte DNA-Fragment zunächst mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten. Im Anschluss wurde die DNA mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN (Hilden, D) weiter verarbeitet.

Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung von DNA

Die Amplifizierung verschiedener DNA-Fragmente aus der chromosomalen DNA erfolgte mittels PCR ("polymerase chain reaction") nach dem Protokoll der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Die Reaktion wurde mit Hilfe des PCR Cyclers Primus 25 advanced® der Firma PEQLAB Biotechnologies (Erlangen, D) durchgeführt.

Reinigung eines PCR Fragments

Nach der Amplifizierung des PCR Fragments wurde die DNA mit dem GeneJET PCR Purification Kit von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) gereinigt. Es wurde nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers vorgegangen.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die genaue DNA Konzentration wurde am Nano-Drop® (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, D) bestimmt.

Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte mit den FastDigest Restriktionsenzymen der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Die eingesetzte Menge und die Reaktionszeit richteten sich

nach den Herstellerangaben des verwendeten Enzyms. Das Reaktionsvolumen betrug zwischen 10 – 100 µl. Die eingesetzte DNA Menge belief sich auf 100 – 10.000 ng.

Ligation von DNA

Die Ligation eines verdauten DNA-Fragments in einen linearisierten Vektor erfolgte mit der T4 DNA Ligase der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D). Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die Inkubationszeit richteten sich nach den Herstellerangaben.

Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Microsynth (Lindau, D) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 1 zu finden. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms Ape v2.0.45 (M. Wayne Davis; <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

3.3.2 Transformation von Bakterien

Herstellung chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen

Bei der Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen wurde nach dem Protokoll von Sambrook & Russel (2001) vorgegangen. Bei der Präparation des *E. coli* ArcticExpress (DE3) RIL wurde zusätzlich Gentamycin (20 µg/ ml) ins Medium der Vorkultur gegeben. Das Antibiotikum wurde dem Medium beigelegt, da *E. coli* ArcticExpress (DE3) RIL ein Plasmid mit Chaperonen enthält. Das Chaperon hilft bei der Faltung der zu produzierenden Proteine während der heterologen Expression.

Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

140 µl chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen wurden mit ~200 ng Plasmid DNA oder 15 µl des Ligationsansatzes transformiert. Dafür wurden die Zellen mit der zugegebenen DNA zunächst 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie für ca. 90 sec bei 42 °C Hitze geschockt und direkt mit 1 ml LB Medium vermischt. Nach 1 h schüttelnder Inkubation wurden die Zellen auf Selektivmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

Transformation natürlich kompetenter *B. subtilis* Zellen

Bei der Herstellung kompetenter *B. subtilis* Zellen wurde sich zu Nutzen gemacht, dass *B. subtilis* zu Beginn der Stationären-Wachstumsphase natürlich kompetent ist. Hierfür wurden

3 ml SMM Medium (Tabelle 4) mit dem entsprechenden Stamm angeimpft. Der Stamm wurde dann über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Morgen wurde 1 ml der Übernachtskultur in 20 ml LS Medium überimpft. Die Zellen wurden weitere 3 h bei 30 °C und 100 rpm wachsen gelassen. Anschließend wurden 1 ml dieser Zellen mit 8 µg linearisierter Plasmid DNA oder chromosomaler DNA vermischt. Nach weiteren 2 h Inkubation der Zellen bei 37 °C wurden sie dann auf Selektivmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

Präparation von *B. megaterium* Protoplasten

Die Präparation von *B. megaterium* MS941 Protoplasten wurde nach Barg *et al.* (2005) durchgeführt.

Transformation kompetenter *B. megaterium* Protoplasten mit Plasmid DNA

Bei der Transformation von *B. megaterium* MS941 Protoplasten mit dem Plasmid pSTH55 wurde nach dem Protokoll von Barg *et al.* (2005) gearbeitet.

3.3.3 Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Die zu analysierende DNA Region wurde mit Cy5-markierten Oligonukleotiden amplifiziert und anschließend wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben gereinigt. Parallel dazu wurde das benötigte Protein mittels Strep-Tag®II Affinitätschromatographie gereinigt (Kapitel 3.5.6).

In jedem Ansatz (20 µl) wurde eine konstante Menge des PCR Fragments innerhalb eines Experiments eingesetzt. Die Menge an verwendetem Protein variierte pro Ansatz. Es wurden hier 0,015 µg – 4 µg verwendet. In jeden Ansatz wurde zudem DNA Bindepuffer (25 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM Na²-EDTA, 2 mM DTT, 10 mM MgCl₂), 5 µg BSA und 200 µg Herringssperma DNA gegeben. Die Proben wurden für 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 6x MassRuler DNA Loading Dye der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) vermischt. Nun wurden die Proben über ein 8 %-iges TAE-Polyacrylamidgel in 1xTAE-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8, 90 mM Borsäure und 1 mM EDTA) elektrophoretisch aufgetrennt (70V, 90 min). Als Marker wurde der MassRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, D) aufgetragen. Nach der Elektrophorese des Gels wurde die Spur mit dem Marker abgetrennt und in eine Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) zum Färben gelegt. Die übrigen Proben wurden mit dem Phosphorimager (Storm 860, GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK) gescannt (Red Fluorescence). Die erhaltenen Daten wurden mit der Image Quant™-Software (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA, USA) ausgewertet.

3.4 Konstruktion von Bakterienstämmen und Plasmiden

3.4.1 Plasmidkonstruktion

pSTH02 & pSTH23: Die Expressionsplasmide pSTH02 und pSTH23 (Abbildung 11) gehen auf das Vaterplasmid pASG-IBA3 der Firma IBA (Göttingen, D) zurück. Die beiden Gene *gbsR* aus *B. subtilis* und *cudC* aus *S. xylosus* C2A wurden zunächst über das StarGate®-Klonierungssystem in den Eintrittsvektor pENTRY kloniert (Tabelle 10; pSTH01 und pSTH22). Anschließend wurden sie in den in Abbildung 11 schematisch dargestellten pASG-IBA3 Vektor über die Esp3I Schnittstellen umklontiert. Beide Gene konnten so über den Anhydrotetracyclin-induzierbaren Promotor heterolog in *E. coli* mit C-terminalem Strep-Tag® II exprimiert werden.

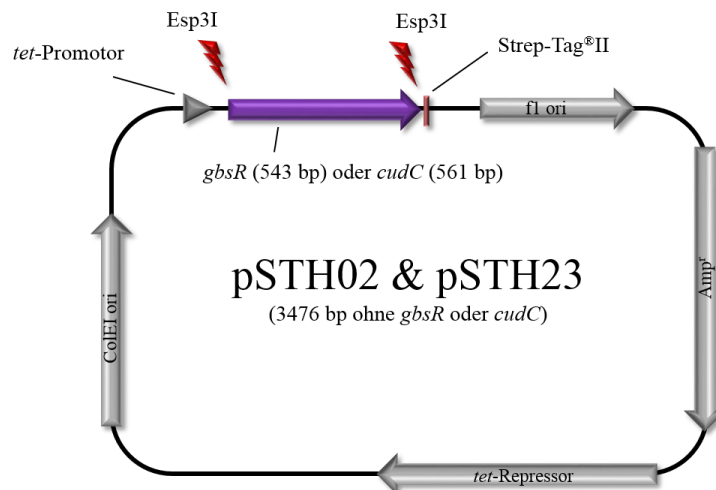


Abbildung 11: Die Plasmide pSTH02 & pSTH23.

Schematisch dargestellt ist die Vektorkarte für die Expressionsplasmide pSTH02 und pSTH23. Es handelt sich um das Ursprungsplasmid pASG-IBA3 der Firma IBA (Göttingen, D), in das zum einen das Insert *gbsR* aus *B. subtilis* und zum anderen *cudC* aus *S. xylosus* C2A kloniert wurde. Beide Gene konnten mit C-terminalen Strep-Tag® II unter Kontrolle eines *tet*-Promotors heterolog exprimiert werden.

pSTH33-36: Aus dem Genom von *B. infantis* NRRL B-14911 (Siefert *et al.*, 2000) wurden die vier verschieden großen Fragmente aus Abbildung 12 (b) amplifiziert. Die dabei verwendeten Primer können Tabelle 1 entnommen werden. Über die an die Fragmente angefügten SmaI und BamHI Schnittstellen, konnten diese in das Vaterplasmid pJMB1 (Abbildung 12 (a)) kloniert werden. In Abbildung 12 (b) ist schematisch gezeigt, welcher Vektor, welches Fragment enthält. Die Plasmide dienen zur Analyse der Genexpression, die mit Hilfe des Reportergens *treA* getestet werden konnte. Die *amyE*-Bereiche auf den Plasmiden wurden für die stabile

Integration ins Genom von *B. subtilis* genutzt. Das genaue Vorgehen ist in Kapitel 3.4.2 beschrieben.

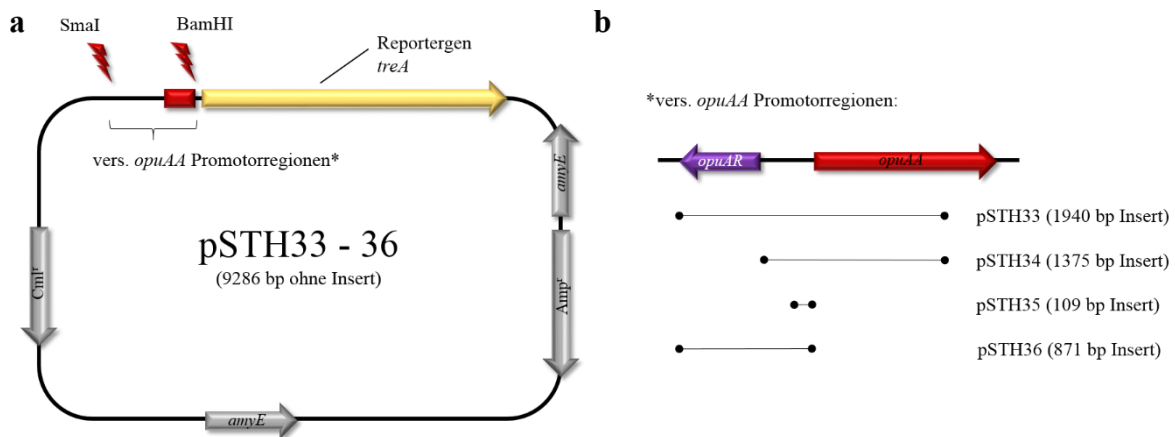


Abbildung 12: Die Plasmide pSTH33-36:

Schematisch dargestellt ist (a) die Vektorkarte der Plasmide pSTH33-36. Es handelt sich um das Vaterplasmid pJMB1 mit verschiedenen großen Inserts der Promotorregion von *opuAA* aus *B. infantis* NRRL B-14911, die vor das Reportergen *treA* kloniert wurden. Die *amyE*-Bereiche dienen der stabilen Integration ins Genom von *B. subtilis* über homologe Rekombination. Diese findet zwischen den identischen Bereichen des *amyE*-Gens im Genom und auf den Plasmiden statt. In (b) sind die verschiedenen Fragmente in der Übersicht gezeigt und dargestellt, welcher Vektor, welches Insert trägt.

pSTH72-74: Bei den Plasmiden pSTH72-74 handelt es sich um Derivate des Plasmids pSTH33. Die Plasmide enthalten verschiedene Deletionen im Promotorbereich des *opuAA* aus *B. infantis* NRRL B-14911. Die genauen Deletionen können Tabelle 13 entnommen werden. Dabei trägt das Plasmid pSTH72 Mutation 1, pSTH73 Mutation 2 und pSTH74 Mutation 3. Die Deletionen wurden wie unter 3.3.1 beschrieben, eingefügt. Die dabei verwendeten Primer können Tabelle 1 entnommen werden.

pSTH75-77: Die Plasmide pSTH75-77 sind Derivate des Plasmids pSTH34. Sie enthalten verschiedene Deletionen im Promotorbereich des *opuAA* aus *B. infantis* NRRL B-14911. Die genauen Deletionen sind in Tabelle 13 aufgeführt. Dabei trägt das Plasmid pSTH75 Mutation 1, pSTH76 Mutation 2 und pSTH77 Mutation 3. Unter 3.3.1 ist beschrieben, wie die Deletionen in die Plasmide eingefügt wurden. Die dabei verwendeten Primer sind in Tabelle 1 zu finden.

pSTH49 & pSTH50: Die beiden Plasmide pSTH49 und pSTH50 (Abbildung 13) sind Derivate des Plasmids pMP_AR1, das ein Expressionsplasmid für die heterologe Expression von *opuAR* aus *B. infantis* NRRL B-14911 ist. Die Überproduktion des OpuAR mit einem C-terminalen Strep-Tag[®]II kann durch AHT induziert werden. Beide Plasmide wurden, wie in Kapitel 3.3.1

geschildert, mutiert. Die Mutation im Protein OpuAR des Plasmids pSTH49 führt zum Aminosäureaustausch N⁹⁸F und bei pSTH50 zu W⁹⁵F.

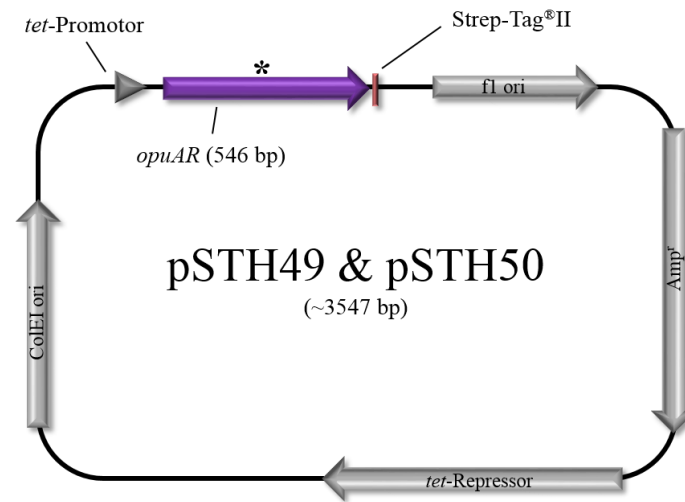


Abbildung 13: Die Plasmide pSTH49 & pSTH50.

Schematische Darstellung der Vektorkarte der beiden Plasmide pSTH49 und pSTH50. Die beiden Plasmide sind Derivate des *opuAR*-Expressionsplasmid pMP_AR1, die durch Mutagenese dahingehen verändert wurden, dass sie beim Protein OpuAR zu einem Aminosäureaustausch von N⁹⁸F (pSTH49) bzw. W⁹⁵F (pSTH50) führen. Mit * gekennzeichnet ist die Lage der beiden Mutationen. Der *tet*-Promotor kann mit AHT induziert werden. Der Strep-Tag®II befindet sich C-terminal.

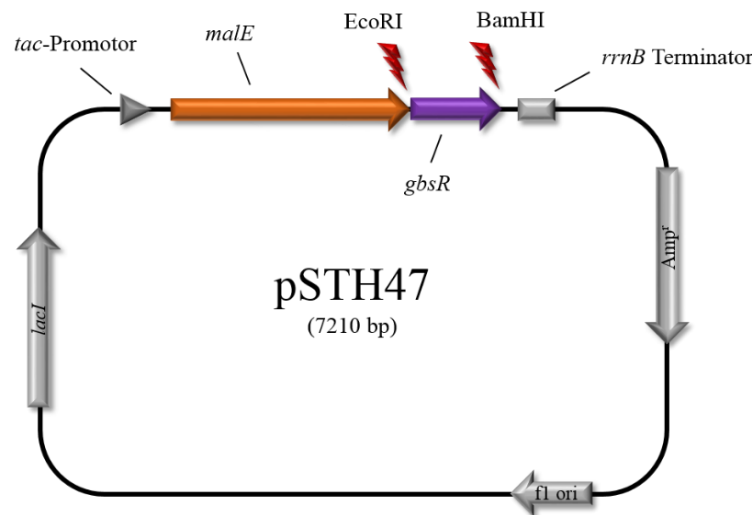


Abbildung 14: Das Plasmid pSTH47.

Aufgezeigt ist hier schematisch der Aufbau des Plasmids pSTH47. Der mit IPTG-induzierbare Promotor wurde für die heterologe Expression in *E. coli* genutzt, um *gbsR* aus *B. subtilis* mit fusioniertem *malE* zu exprimieren. MalE diente zudem als Tag für die Reinigung mit einer Amylosesäule. Kloniert wurde *gbsR* über die beiden Schnittstelle EcoRI und BamHI.

pSTH47: Das Plasmid pSTH47 (Abbildung 14) diente der Produktion des GbsR Regulatorproteins aus *B. subtilis* mit dem Maltosebindeprotein MalE als N-terminale Fusion

und Tag zur Reinigung des Proteins. Das Insert *gbsR* wurde mit den beiden Primern MAL-C2 for und MAL-C2 rev amplifiziert und über die beiden Schnittstellen EcoRI und BamHI in das Vaterplasmid pMAL-C2 kloniert. Die heterologe Expression in *E. coli* wurde durch die Zugabe von IPTG induziert.

pSTH55: Das Plasmid pSTH55 (Abbildung 15) wurde für die heterologe Expression von *gbsR* aus *B. subtilis* in *B. megaterium* verwendet. Für die Klonierung in das Vaterplasmid pPT7 über die beiden Schnittstellen SpeI und SacI wurde *gbsR* mit Strep-Tag®II ausgehend vom Plasmid pSTH02 amplifiziert. Hierfür wurden die beiden Primer 3STOP1623hp GbsR for und 3STOP1623hp GbsR rev genutzt. In *B. megaterium* wurde die heterologe Expression durch Zugabe von Xylose gestartet.

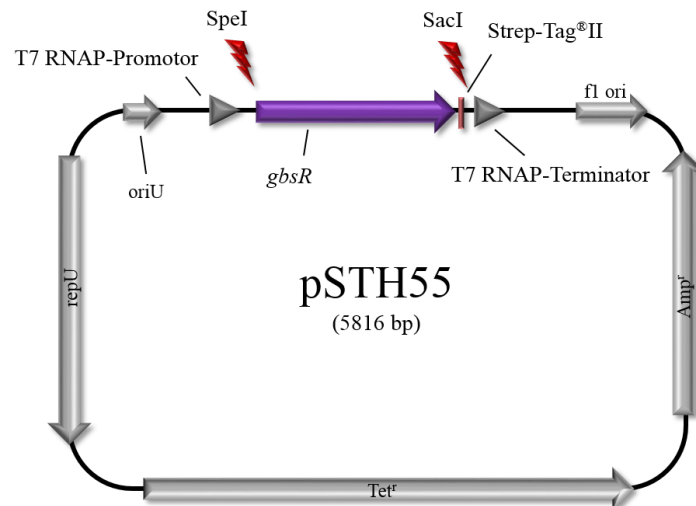


Abbildung 15: Das Plasmid pSTH55.

Die Plasmidkarte des Expressionssystems pSTH55 ist hier schematisch dargestellt. Das Gen *gbsR* aus *B. subtilis* mit Strep-Tag®II wurde über die beiden Schnittstellen SpeI und SacI in das Ausgangsplasmid pPT7 kloniert. In *B. megaterium* startete die Expression durch Zugabe von Xylose.

3.4.2 Konstruktionen von *treA*-Reportergenfusionsstämmen

Alle zur Konstruktion von *treA*-Reportergenfusionsstämmen verwendeten Plasmide sind Derivate des Ausgangsplasmids pJMB1. Dieses Plasmid kann nach der Linearisierung durch doppelt homologe Rekombination in das chromosomale *amyE*-Gen des Stammes *B. subtilis* integriert werden. Die Stämme werden nach der Transformation (3.3.2) auf Chloramphenicol selektiert. Bei der doppelten homologen Rekombination wird das *amyE*-Gen unterbrochen und die Integration des Plasmids in das Genom kann mit dem Test auf Amylase-Aktivität (3.5.1) überprüft werden. Es wurde jeweils der Ausgangsstamm STHB05 mit verschiedenen Plasmiden

transformiert. Die so entstandenen Stämme STHB10 – 13 enthalten dabei Teile der Plasmide pSTH33 – 36 und die Stämme STHB68 – 73 Bereiche der Plasmide pSTH72 – 77. Die drei Stämme STHB04, STHB06 und STHB07 wurden mit dem linearisierten Plasmid pSTH34 transformiert. Es entstanden dabei die Stämme STHB65 – 67.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Nachweis der Amylase-Aktivität

Bei dem Nachweis auf Amylase-Aktivität wurde überprüft, ob der vorliegende *B. subtilis*-Stamm ein defektes *amyE*-Gen im Genom aufweist. Dies wurde kontrolliert, um sicherzustellen, dass an dieser Stelle verschiedene Plasmide ins Genom integriert wurden. Hierfür wurde der zu testende Klon auf eine LB Platte mit 1 % Stärke ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit einer Glaspipette von der Agarplatte entfernt. Die Platte wurde nun mit Grams Jodlösung (0,5 % (w/v) Jod, 1 % (w/v) Kaliumiodid in H₂O) bedeckt. Die Stärke im Agar begann sich nach kurzer Zeit blau zu färben. Blieben die Höfe der Zellausstriche hell, so wurde die Stärke an dieser Stelle von den *B. subtilis* Zellen abgebaut. War eine Blaufärbung zu sehen, sind die Zellen nicht mehr in der Lage das Enzym α -Amylase zu bilden. Die Zellen besitzen somit kein intaktes *amyE*-Gen mehr und das Plasmid wurde erfolgreich im Genom integriert.

3.5.2 Quantifizierung der TreA-Aktivität

Mit der Quantifizierung der TreA-Aktivität konnte das Expressionslevel verschiedener *gbsA*'- und *opuAA*'-*treA*-Fusionen bestimmt werden. Das hier verwendete Reporterenzym TreA kodiert für eine salztolerante Phospho- α -(1,1)-Glucosidase, die das Substrat pNPG (para-Nitrophenyl- α -Glucopyranosid) in ein gelb gefärbtes Reaktionsprodukt umwandelt, welches photometrisch quantifiziert werden kann (Gotsche & Dahl, 1995; Schöck *et al.*, 1996). Die Zellen aller in dieser Arbeit verwendeten *gbsA*-Fusionen wurden wie in Nau-Wagner *et al.* (2012) behandelt.

Die Stämme, die eine *opuAA*'-*treA*-Fusion tragen, wurden zunächst in 3 ml LB von Platte angeimpft. Nach dreistündigem Wachstum bei 37 °C wurden 500 μ l der Kultur in 20 ml SMM Medium überführt und nach weiteren 3,5 h die entsprechende Hauptkultur mit oder ohne 1,2 M NaCl beimpft und bis auf eine OD₅₇₈ von 1,5 herangezogen. Je nach Bedarf wurde dem Medium zusätzlich 1 mM eines kompatiblen Soluts hinzugegeben. Bei Erreichen der gewünschten OD₅₇₈

wurden je 1,5 ml der Zellen geerntet (10 min, 13.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

Nach dem Auftauen wurde die Zelle in 500 µl Z-Puffer (Miller, 1972) mit Lysozym (1 mg/ml) resuspendiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden nun durch erneutes Zentrifugieren (5 min, 13.000 rpm) vom Überstand getrennt. 400 µl des Überstands wurden mit weiteren 400 µl des Z-Puffers gemischt. Mit Zugabe von 200 µl einer pNPG-Lösung (4 mg/ml in 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5) wurde die Reaktion gestartet. Die Proben wurden bei 28 °C inkubiert bis eine Gelbfärbung zu sehen war. Nun wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl einer 1 M Na₂CO₃ gestoppt. Bei einer Wellenlänge von 420 nm wurde die Extinktion (E₄₂₀) der Lösung photometrisch bestimmt. Als Referenzwert wurde je eine Probe ohne Zellen mitgeführt. Zudem wurden jeweils zwei technische und zwei biologische Parallelen angefertigt. Letztlich wurde die genaue TreA-Enzymaktivität über folgende Formel berechnet:

$$A_{\text{TreA}} = (1500 * \Delta E_{420}) / (OD_{578} * V_{\text{ml}} * \Delta t_{\text{min}} * 0,75)$$

Dabei ist: A_{TreA} die spezifische TreA-Aktivität in U/mg Protein
 ΔE_{420} die Extinktion von o-Nitrophenol bei 420 nm abzüglich des Blinwerts
 V_{ml} das Volumen des verwendeten Zellextrakts in ml
 Δt_{min} die Reaktionszeit vom Start bis zum Stoppen der Reaktion

3.5.3 Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli*

Die Produktion der GbsR-Typ Regulatorproteinen erfolgte in *E. coli* BL21 oder ArcticExpress (DE3) RIL Zellen. Die Kultivierung erfolgte hierbei in MMA Medium (Tabelle 3). Vor der heterologen Expression wurde der entsprechende *E. coli* Stamm zunächst mit einem Expressionsplasmid, das das entsprechende Gen unter einem induzierbaren Promotor trägt, transformiert. Die Transformation selbst erfolgte wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben. Die transformierten Zellen wurden im Anschluss auf LB Agar mit Ampicillin (100 µg/ml) selektiert. Eine Vorkultur wurde mit einigen Klonen beimpft und über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Hauptkultur (1000 ml) auf eine OD₅₇₈ von 0,1 inokuliert und weiterhin bei 37 °C geschüttelt. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,5 wurde den Zellen 100 µl Anhydrotetracyclin (2 mg/ml) zugegeben, um den *tet*-Promotor zu induzieren. Nach weiteren zwei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen bei 4 °C und 4.600 rpm für 20 min geerntet und bei -20 °C gelagert.

Bei der Produktion mit dem *E. coli* Stamm ArcticExpress (DE3) RIL wurde der Vorkultur zusätzlich zum Ampicillin (100 µg/ml) 20 µg/ml Gentamycin beigefügt, da dieser Stamm ein weiteres Plasmid mit Chaperongen trägt. Nach dem Überimpfen in die Hauptkultur wurde auf den Zusatz von Gentamycin verzichtet. Bei einer OD₅₇₈ von 0,5 wurde die Hauptkultur runtergekühlt auf 18 °C. Nach Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,7 wurde mit AHT (100 µl; 2 mg/ml) induziert. Die Zellen wurden weitere 16 h inkubiert und letztlich wie oben beschrieben geerntet.

3.5.4 Heterologe Expression von GbsR in *B. megaterium*

Die Überproduktion des GbsR Regulatorproteins aus *B. subtilis* wurde wie in Gamer *et al.* (2009) beschrieben, durchgeführt.

3.5.5 Heterologe Expression von GbsR mit anfusioniertem Maltosebindeprotein

Bei der Überproduktion des GbsR aus *B. subtilis* mit anfusionierte Maltosebindeprotein (GbsR-MBP-Fusionsprotein), wurde wie im Protokoll des "pMALTM Protein Fusion & Purification System" Systems der Firma New England Biolabs (Massachusetts, USA) beschrieben, vorgegangen.

3.5.6 Proteinreinigung via Strep-Tag[®] Affinitätschromatographie

Die in Resuspensionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 25 % Glycerin, 2 mM DTT, 0,4 mM EDTA, 0,5 mM Pefabloc, 0,5 mM Benzamidin) gelösten Zellen aus der Heterologen Expression in *E. coli* oder *B. megaterium* wurden zunächst mittels French Press (French[®] Pressure Cell Press, American Instrument Company, Division of Travenol Laboratories Inc., Silver Spring, Maryland, USA) bei 1000 bar aufgeschlossen. Danach wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei 35.000 rpm und 4 °C für 35 min abgetrennt.

Die Reinigung an sich erfolgte entweder mit der FPLC, der Äkta pure oder der Äkta Start (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK) jeweils nach demselben Prinzip. Zunächst wurde der Überstand nach dem Zentrifugieren in einen 50 ml Loop (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK) überführt und über diesen, auf die in Waschpuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) equilibrierte, 10 ml Strep-Tactin[®]-Säule (5 mg/ml, IBA, Göttingen, D) aufgetragen. Die GbsR-Typ Proteine besitzen einen Strep-Tag[®]II, der an das Strep-Tactin[®]-Säulenmaterial bindet. Um das gewünschte Protein von den anderen im Überstand vorhandenen Proteinen und Molekülen zu trennen, wurde die Säule nach dem Auftragen mit 100 ml Waschpuffer gewaschen. Um nun das GbsR-Typ Protein von der Säule zu lösen, wurde 30 ml Elutionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 2,5 mM Desthiobiotin) auf die Säule

gegeben. Da das Desthiobiotin im Elutionspuffer eine höhere Affinität zum Strep-Tactin® besitzt als der Strep-Tag®II, wird das Protein von der Säule verdrängt. Das Eluat wurde in 3 ml Fraktionen von einem Fraktionskollektor aufgefangen. Um nun auch das gebundene Desthiobiotin von der Säule zu lösen, wurde die Säule mit 120 ml Regenerationspuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 2,5 mM HABA) regeneriert. Abschließend wurde die Säule mit 100 ml Waschpuffer final gewaschen und die Pumpen mit Wasser gespült.

Im Anschluss wurde die Konzentration des gereinigten Proteins in den einzelnen Fraktionen am Nano-Drop® (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, D) bestimmt. Um höher konzentriertes Protein für folgende Analysen zu erhalten, wurden mehrere Fraktionen in einem "Vivaspin 6 concentrators" (10 kDa Ausschlussgröße; Sartorius Stedim Biotech S. A., Aubagne, FR) vereint und bei 10 °C und 4.000 rpm zentrifugiert. Bei Bedarf wurde das Protein in einen anderen Puffer mittels "Vivaspin 6 concentrators" umgepuffert und letztlich bei 4 °C gelagert.

3.5.7 Proteinreinigung via Maltosebindeprotein-Tag Affinitätschromatographie

Bei der Proteinreinigung, mit dem an das GbsR aus *B. subtilis* anfusionierte Maltosebindeprotein als Tag, wurde wie im Protokoll des "pMAL™ Protein Fusion & Purification System" Systems der Firma New England Biolabs (Massachusetts, USA) beschrieben, vorgegangen.

3.5.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Bestimmung der Reinheit eines Proteins nach der Reinigung oder zur Überprüfung der Überproduktion eines Proteins wurden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS Page) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Dafür wurden 15 %ige SDS-Gele verwendet, die mit Elektrophorese-Kammern der Firma Biorad (Hercules, California, USA) hergestellt wurden. Vor der Elektrophorese wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 8 % Glycerin, 15,6 µM DTT, Bromphenolblau) gemischt und für 10 min bei 95 °C aufgekocht. Im Anschluss wurden die Proben 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand auf das SDS-Gel geladen. Als Laufpuffer wurde 1xSDS-Laufpuffer (25 mM Tris/HCl pH 8,8, 192 mM Glycerin, 0,1 % (w/v) SDS) genutzt. Die Auftrennung erfolgte für 80 min bei 30 mA. Als Größenstandard wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die SDS-Gele wurden mit der Färbelösung InstantBlue Protein Stain der Firma Expedeon (San Diego, USA) 10 min gefärbt. Im Anschluss wurden sie in Wasser entfärbt.

3.5.9 Gelfiltration

Zur Untersuchung auf Aggregate und Bestimmung der nativen Größe der GbsR-Typ Regulatorproteine wurde eine Gelfiltrationschromatographie mit den Proteinen durchgeführt. Verwendet wurden hier die beiden Säulen HiLoad Superdex 800pg und HiLoad Superdex 200pg, die an die Äkta pure (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK) angeschlossen waren. Vor dem Auftragen von 1 - 2 mg Protein, wurde die verwendete Säule zuvor mit Waschpuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) equilibriert.

3.5.10 Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Bindeaffinität

Um die Bindeaffinität der verschiedenen GbsR-Typ Regulatorproteinen zu den unterschiedlichen kompatiblen Soluten zu bestimmen, wurde ein fluoreszenzspektroskopisches Assay verwendet. Hierbei wird über die intrinsische Tryptophanfluoreszenz die Bindung des Substrats an das zu testende Protein bestimmt. Als Grundlage wurden sich die in den GbsR-Typ Regulatorproteinen vorhandenen Tryptophane zu Nutze gemacht, da diese nach der Anregung bei einer Wellenlänge von 280 nm selbst fluoreszieren. Mit dem Fluoreszenzspektrometer (Cary Eclipse, VARIAN, Palo Alto, CA, USA) konnte ein Emissionsspektrum von 290 bis 400 nm aufgezeichnet werden. Es wurde zu 1 ml Protein (5 µM) eine nach und nach steigende Menge an zu testendem kompatiblen Solut gegeben. Mit einem Plastikstäbchen wurde Beides vermischt und jeweils nach 1 Minute Inkubation das Emissionsspektrum aufgezeichnet. Hierbei wurden die Änderungen der Fluoreszenzintensität ermittelt, die zur Ermittlung der Bindungsaffinität (K_D) verwendet wurde. Die Änderungen folgen den Gesetzmäßigkeiten einer Sättigungsformel, der hier aufgezeigten Formel:

$$F = F_0 + (\Delta F * [S_0] / ([S_0] + K_D))$$

Dabei ist: F die theoretische Fluoreszenzintensität für die eingesetzte Substratkonz.

F_0 die gemessene Fluoreszenzintensität ohne Substrat

ΔF die maximale Änderung der Fluoreszenzintensität

S_0 die bei dieser Messung eingesetzte Substratkonzentration

K_D die Bindungskonstante; das Maß für die Affinität eines Proteins zum Ligand

Die Analyse und Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) vorgenommen.

3.6 Bioinformatische Analysen

Zur bioinformatischen Analyse der GbsR-Typ Proteine und deren Gennachbarschaften wurde die Website des "U. S. Department of Energy (DOE) Joint Genome Institute" (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi>, (Nordberg *et al.*, 2014)) verwendet. Als Ausgangsprotein wurde die Aminosäuresequenz von GbsR aus *B. subtilis* genutzt.

Beim Vergleich von Basen- oder Aminosäuresequenzen wurde mit dem Onlineprogramm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) gearbeitet. Die phylogenetischen Stammbäume wurden mit Hilfe von iTOL (<http://itol.embl.de/>) konstruiert und mit Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems Software, Ireland) weiter bearbeitet.

Modelle von Kristallstrukturen wurden mit Hilfe der Homepage SWISS Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) erstellt. Die erhaltenen Strukturen wurden mit dem Programm Pymol v1.7.6 (<https://www.pymol.org/>) bearbeitet.

4. Ergebnisse

4.1 Verbreitung von GbsR-Typ Regulatorproteinen

4.1.1 Taxonomische Verbreitung

Das Regulatorprotein GbsR ist in *B. subtilis* für die transkriptionelle Regulation der beiden Operone *gbsAB* und *opuB* zuständig (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Die beiden Gene des *gbsAB*-Operons kodieren in *B. subtilis* für zwei Dehydrogenasen, die an der Glycin Betain Synthese beteiligt sind (Boch *et al.*, 1996, 1997). Direkt vor *gbsAB*, aber in entgegengesetzter Orientierung, liegt das Gen für den Cholin-spezifischen Repressor GbsR. Wie Nau-Wagner *et al.*, (2012) bereits feststellen konnte, tauchen eine Reihe weiterer *gbsR* ähnlicher Gene in der Genumgebung von bereits analysierten Glycin Betain Synthese-Operonen in anderen Organismen auf. Auch neben Genclustern, die für verschiedene ABC-Transporter kodieren sind *gbsR* ähnliche Gene entdeckt worden. Es scheint sogar einige Bakterien zu geben, die mehrere dieser GbsR-Typ Regulatoren besitzen. Einer davon ist *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Um aufzuklären, wie weit GbsR-Typ Regulatoren tatsächlich in der mikrobiellen Welt verbreitet sind, wurde im Folgenden eine bioinformatische Analyse durchgeführt. Zudem soll klar gestellt werden, ob eine Klassifizierung in zwei oder mehrere Gruppen von *gbsR* ähnlichen Genen anhand der Gennachbarschaft getroffen werden kann.

Für eine genaue Übersicht der Verteilung weiterer GbsR-Typ Regulatoren wurde ein phylogenetischer Baum erstellt. Der in den Abbildung 16 & 17 dargestellte Baum basiert auf einem Vergleich der Aminosäuresequenz von GbsR aus *B. subtilis*. Die in dem Kladogramm dargestellten GbsR-Typ Regulatoren wurden durch BLAST Analysen der Datenbank des U. S. Department of Energy (DOE) Joint Genome Institute (JGI) gefunden. Tauchten sequenzidentische GbsR-Typ Regulatoren auf, wurde im phylogenetischen Baum lediglich ein Vertreter verwendet. Der dem Kladogramm zugrunde liegende Sequenzvergleich aller gefundenen Sequenzen, wurde wie unter Kapitel 3.6 beschrieben, angefertigt. Anhand dessen wurde der phylogenetische Baum auf der Homepage iTOL erarbeitet. Im Kladogramm sind keine evolutionären Distanzen berücksichtigt.



Abbildung 16: Taxonomische Verbreitung von *gbsR* ähnlichen Genen innerhalb der Domänen *Bacteria* und *Archaea*.

Dargestellt ist ein phylogenetischer Baum, der auf einem Vergleich der Aminosäuresequenz von GbsR aus *B. subtilis* basiert. Zu sehen sind insgesamt 238 *gbsR* ähnliche Gene in 198 Stämmen. Phylogenetische Distanzen sind nicht berücksichtigt.

Anhand des phylogenetischen Baums konnte gezeigt werden, dass *gbsR* ähnliche Gene sowohl innerhalb der Domäne *Bacteria* als auch der *Archaea* verbreitet sind. Insgesamt wurden 238 putative GbsR-Typ Regulatoren in 198 Stämmen gefunden. Davon gehören 187 Stämme zur Domäne der *Bacteria* und nur 20 zur Domäne der *Archaea*.

Die meisten GbsR-Typ Proteine kommen im Phylum der *Firmicutes* vor. Wie Abbildung 16 entnommen werden kann, werden die *Firmicutes* getrennt durch Mikroorganismen, die anderen Domänen angehören. Mitglieder dieser Gruppe von Mikroorganismen zählen größtenteils ebenfalls zur Domäne der *Bacteria* wie beispielsweise die *Proteobacteria*, die *Verumicrobia* oder die *Bacterioidetes*, allerdings auch zur Domäne der *Archaea* wie die *Euryarchaeota*. Die GbsR-Typ Regulatoren der *Firmicutes* werden so quasi in zwei Gruppen getrennt. 40 dieser insgesamt 149 untersuchten *Firmicutes* Stämme tragen mehr als ein *gbsR* ähnliches Gen. Davon haben sogar zwei Stämme (*Bacillus ainingensis* DSM 18341 und *Pontibacillus marinus* DSM 16465) insgesamt 5 Homologe GbsR-Typ Regulatoren.

4.1.2 Die Transporter-Klasse

Der phylogenetische Baum kann anhand zweier Kriterien in drei große Klassen unterteilt werden. Zum einen aufgrund der taxonomischen Aufteilung innerhalb der verschiedenen Domänen und Phyla und zum anderen bezüglich der *gbsR* Gennachbarschaft. Wie Abbildung 17 entnommen werden kann, besteht die erste Klasse ausschließlich aus Bakterien des Phylums *Firmicutes*. Sie wird als Transporter-Klasse bezeichnet, da angrenzend an das *gbsR* immer in entgegengesetzter Orientierung ein Gencluster mit der Annotation für einen ABC-Transporter liegt. In der Genumgebung dieser 87 *gbsR* ähnlichen Gene kommen sowohl Gencluster für OpuA-, OpuB- als auch OpuC-Typ Transporter, wie sie aus *B. subtilis* bekannt sind, vor. Neben den ABC-Transportern für kompatible Solute sind in der Transporter-Klasse sechs weitere ABC-Transporter zu finden, die allerdings als spezifische Transporter für Natrium annotiert sind. Auffällig hierbei ist, dass diese meist nicht direkt neben dem Regulator vorzufinden sind oder nicht alle drei typischen Komponenten eines ABC-Transporters vorhanden sind.

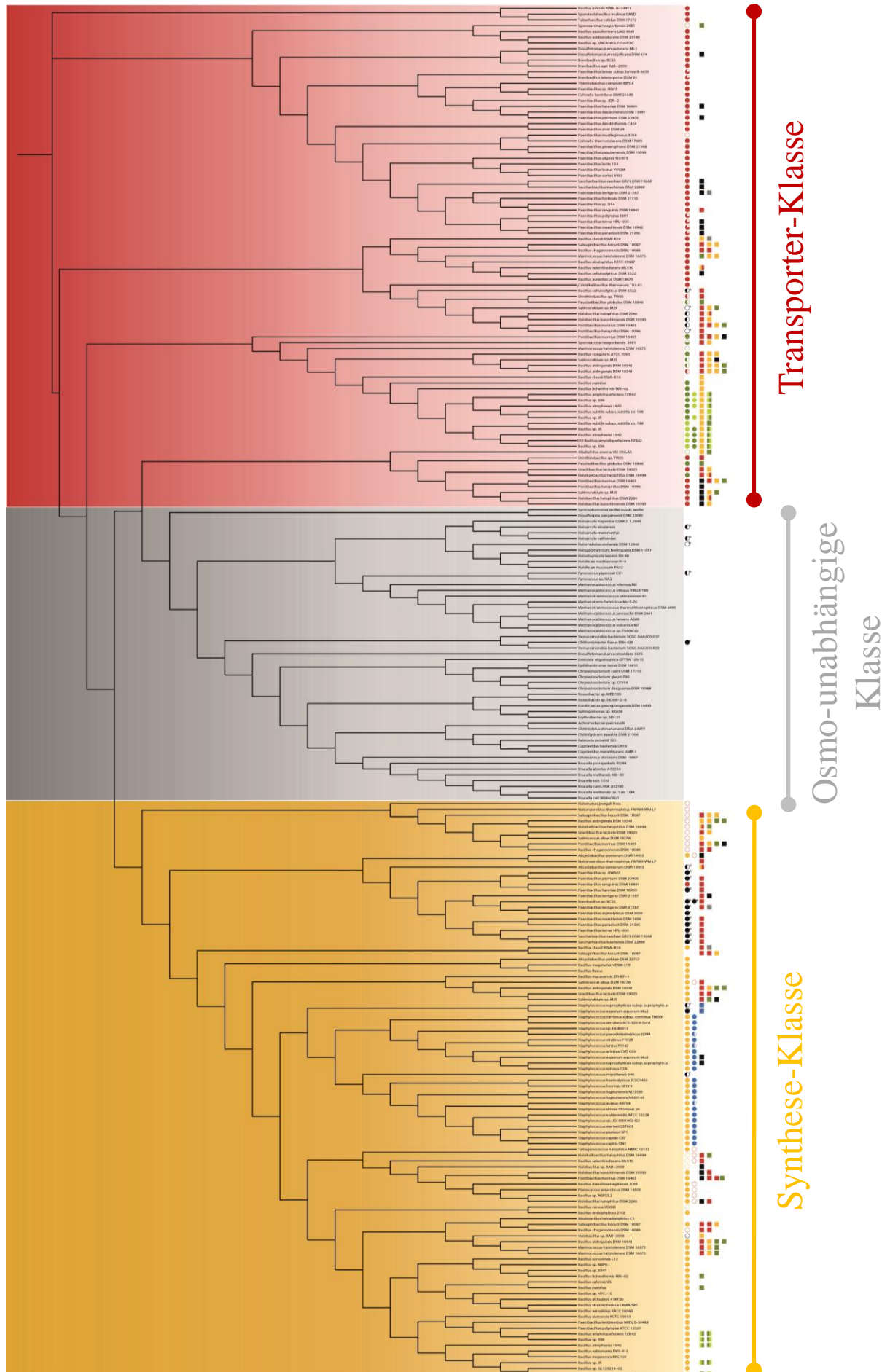


Abbildung 17: Übersicht der Gruppierung *gbsR* ähnlicher Gene in drei spezifische Klassen.

Dargestellt ist der phylogenetische Baum aus Abbildung 16. Das Kladogramm kann aufgrund der Taxonomie der Stämme und aufgrund der Gennachbarschaft der *gbsR* ähnlichen Gene in drei Gruppen aufgeteilt werden. Die verschiedenen farbigen Kreise zeigen an, welche Art von Operon angrenzend an das *gbsR* ähnliche Gen im Genom vorhanden ist. (●) entsprechen *opuA*-Operonen, (●) *opuB*-Operonen, (●) *opuC*-Operonen, (●) *gbsAB*-Operonen und (●) *opuD*-Genen wie sie aus *B. subtilis* bekannt sind. Die schwarzen Kreise stehen für osmotisch-unabhängige Transporter mit der Spezifität für ^aNatrium, ^bEisen(III)zitat, ^cABC-verwandt, ^dKohlenhydrat, ^e2-Aminoethylphosphat oder ^fMolybdat. Sind die Kreise nicht ausgemalt, zeigt dies an, dass sich kein vollständiges Operon neben dem *gbsR* ähnlichen befindet. Sind sie nur halb gefüllt, befindet sich das Operon nicht unmittelbar neben dem *gbsR* ähnlichen Gen. Die symbolischen Quadrate zeigen an, ob es im selben Bakterium weitere *gbsR* Gene gibt. (■) entsprechen *opuA*-Operonen, (■) *opuB*-Operonen, (■) *opuC*-Operonen, (■) *gbsAB*-Operonen wie sie aus *B. subtilis* bekannt sind. (■) zeigen Gene an, die für osmotisch-unabhängige Transporter kodieren.

Da das Vorkommen der drei ABC-Transporter im Stammbaum deutlich geclustert ist, wird eine weitere Untergruppierung der Transporter-Klasse in OpuA-Untergruppe und OpuB/OpuC-Untergruppe vorgenommen, wie Abbildung 18 entnommen werden kann. In der OpuA-Untergruppe sind fast ausschließlich *gbsR* ähnliche Gene mit einem vollständigen putativem *opuA*-Operon zu finden. Aus diesem Grund, werden die *gbsR* ähnlichen Gene dieser Untergruppe von mir im weiteren Verlauf umbenannt in *opuAR* Gene (osmoprotectant uptake OpuA Regulator). In dieser Untergruppe an erster Stelle des Stammbaums zu finden ist das OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911. Das an OpuAR angrenzende Gencluster kodiert für einen OpuA Transporter mit dem gleichen Aufnahmespektrum für kompatible Solute, wie das des OpuA Transporters aus *B. subtilis* (Arnhold, 2011). In dieser Gruppe sind insgesamt 41 *Firmicute* vorhanden, die wie *B. infantis* NRRL B-14911 neben dem *opuAR* Gen ein vollständiges *opuA* Gencluster aufweisen. Es gibt allerdings auch verschiedenen Variationen der Genclusteranordnung (Abbildung 19). Die sechs Stämme *Paenibacillus larvae subsp. larvae* B-3650, *Brevibacillus laterosporus* DSM 25, *Paenibacillus polymyxa* E681, *Paenibacillus terrae* HPL-003, *Paenibacillus massiliensis* DSM 16942 und *Paenibacillus panacisoli* DSM 16942 beispielsweise besitzen ebenfalls die Gene für einen vollständigen OpuA-Typ Transporter. Besonders ist hier allerdings, dass die Permease und das Substratbindeprotein als ein Gen annotiert sind.

Das *opuA* Genclusters von *Ornithinibacillus sp.* TW25 grenzt nicht direkt an das *opuAR* an. Zwischen *opuAR* und putativen *opuA*-Operon liegen sieben weitere Gene, deren Funktion bisher ungeklärt ist (Abbildung 19).

Insgesamt zwei Stämme dieser Gruppe tragen nur Teile des *opuA*-Operons. Darunter befindet sich auch das Bakterium *Sporosarcina newyorkensis* 2681. Wie in Abbildung 19 dargestellt, sind nur die beiden Gene für die ATPase und die Permease vorhanden. Das Substratbindeprotein ist nicht in der näheren Genumgebung zu finden. Auch *Paenibacillus*

mucilaginosus 3016 fehlt das Substratbindeproteine und zusätzlich das ATP Bindepotein zu einem vollständigen OpuA-Typ Transporter.

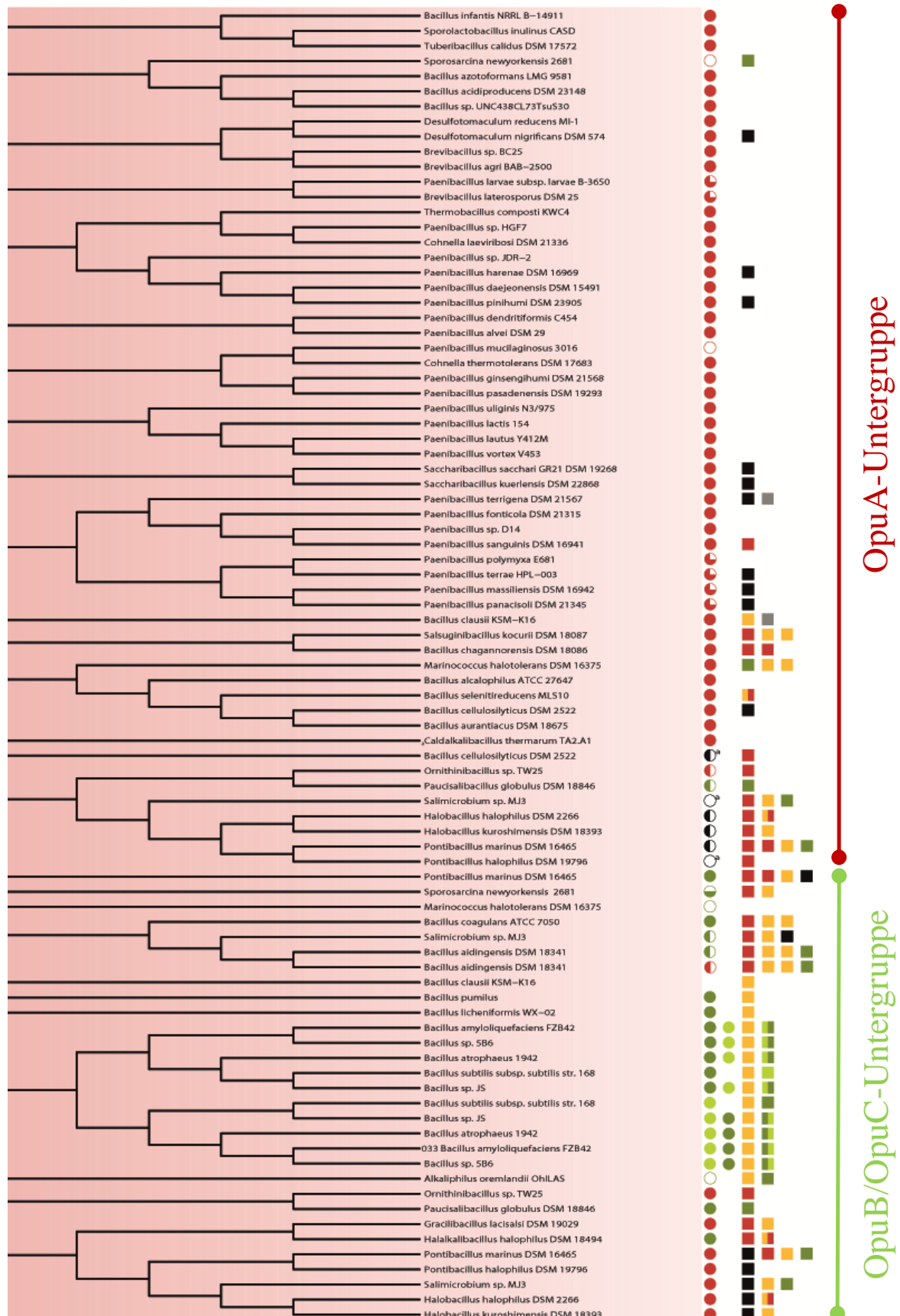


Abbildung 18: Verbreitung von *gbsR* ähnlichen Genen innerhalb der Transporter-Klasse und deren Untergruppierung.

Zu sehen ist die Nahansicht der Transporter-Klasse aus Abbildung 17. Die Untergruppierung dieser Klasse wurde aufgrund des angrenzenden Opu-Transportes an das *gbsR* ähnliche Gen vorgenommen. Die verschieden farbigen Kreise zeigen an, welche Art von Operon angrenzend an das *gbsR* ähnliche Gen im Genom vorhanden ist. (●) entsprechen *opuA*-Operonen, (●) *opuB*-Operonen und (●) *opuC*-Operonen wie sie aus *B. subtilis* bekannt sind. Die schwarzen Kreise stehen für osmotisch-unabhängige Transporter mit der Spezifität für ^aNatrium, ^bEisen(III)zitrat, ^cABC-verwandt, ^dKohlenhydrat, ^e2-Aminoethylphosphat oder ^fMolybdat. Sind die Kreise nicht ausgemalt, zeigt dies an, dass sich kein vollständiges Operon neben dem *gbsR* ähnlichen befindet. Sind sie nur halb gefüllt, befindet sich das Operon nicht unmittelbar neben dem *gbsR* ähnlichen Gen. Die symbolischen Quadrate zeigen an, ob es im selben Bakterium weitere *gbsR* Gene gibt. (■) entsprechen *opuA*-Operonen, (■) *opuB*-Operonen, (■) *opuC*-Operonen, (■) *gbsAB*-Operonen wie sie aus *B. subtilis* bekannt sind. (■) zeigen Gene an, die für osmotisch-unabhängige Transporter kodieren.

Die zweite Untergruppe der Transporter-Klasse ist die OpuB/OpuC-Untergruppe. In dieser sind hauptsächlich *gbsR* ähnliche Gene zu finden, die angrenzend ein putatives *opuB*- oder *opuC*-Operon aufweisen. Entsprechend werden diese *gbsR* ähnlichen Gene im Folgenden als *opuBR* bzw. *opuCR* bezeichnet (osmoprotectant uptake OpuB/C Regulator).

Insgesamt 18 Stämme besitzen in dieser Gruppe ein vollständiges *opuB*- bzw. *opuC*-Operon wie sie aus *B. subtilis* bekannt sind. Während OpuB aus *B. subtilis* als ein Cholin-spezifischer Transporter bekannt ist (Bremer, 2001; Kappes *et al.*, 1999), handelt es sich bei OpuC um den ABC-Transporter mit einem sehr großen Aufnahmespektrum in *B. subtilis* (Bashir *et al.*, 2014a; Broy *et al.*, 2015; Jebbar *et al.*, 1997; Kempf & Bremer, 1998). Die fünf *Bacillus*-Stämme *B. subtilis* 168, *B. sp* JS, *B. atrophaeus* 1942, *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *B. sp*. 5B6 aus dieser Gruppe haben sogar jeweils beide Gencluster neben dem entsprechenden *gbsR* ähnlichen Gen. Mit Ausnahme von *B. subtilis* selbst, sind die beiden Gencluster inklusive des jeweiligen *opuBR* bzw. *opuCR* direkt aneinander grenzend auf dem Genom organisiert. Insgesamt taucht das *opuBR-opuB*-Gencluster nur in diesen fünf *Bacilli* auf, wo es vermutlich durch eine Genduplikation des *opuCR-opuC*-Genclusters entstanden ist (Broy, 2015).

Wie schon für die OpuA-Untergruppe beschrieben, gibt es auch hier verschiedene Varianten, wie das Gencluster angeordnet sein kann. So gibt es z. B. zwei Bakterienstämme, die alle Gene für einen OpuC Transporter aufweisen, allerdings nicht direkt an *opuCR* angrenzen. Wie für *Bacillus ainingensis* DSM 18341 exemplarisch in Abbildung 19 dargestellt, liegen zwei weitere Gene mit unbekannter Funktion zwischen dem putativen Operon und dem möglichen Regulator OpuCR. Bei *Salimicrobium sp.* MJ3 befindet sich lediglich ein Gen zwischen *opuCR* und annotiertem Transporter. Zudem interessant ist hierbei, dass das entsprechende *opuCR* nicht antilinear zum angrenzenden Operon vorzufinden ist, wie es ansonsten für alle *gbsR* ähnlichen Gene der Fall ist.

Neben *Marinococcus halotolerans* DSM 16375 und *Alkaliphilus oremlandii* OhILAS, die beide lediglich eine Komponente des OpuC Transporters (Permease bzw. ATPase) neben dem *opuCR* Gen aufweisen, gibt es ein weiteres Bakterium, das mehr als der üblichen vier Komponenten für OpuC aufweist. Es handelt sich hierbei um *Sporosarcina newyorkensis* 2681. Der Stamm hat eine zusätzliche ATPase. Auch die Genanordnung weicht von denen der anderen möglichen *opuC*-Operone ab, wie Abbildung 19 entnommen werden kann.

Zu den bisher beschriebenen *opuB*- und *opuC*-Genclustern tauchen in dieser Untergruppe noch sieben weitere OpuA-Typ Gencluster neben den *gbsR* ähnlichen Genen auf. Alle sieben *opuAR*-*opuA*-Gencluster befinden sich im Stammbaum im untersten Bereich dieser Untergruppe und sehen wie exemplarisch für *B. infantis* NRRL B-14911 gezeigt, aus.

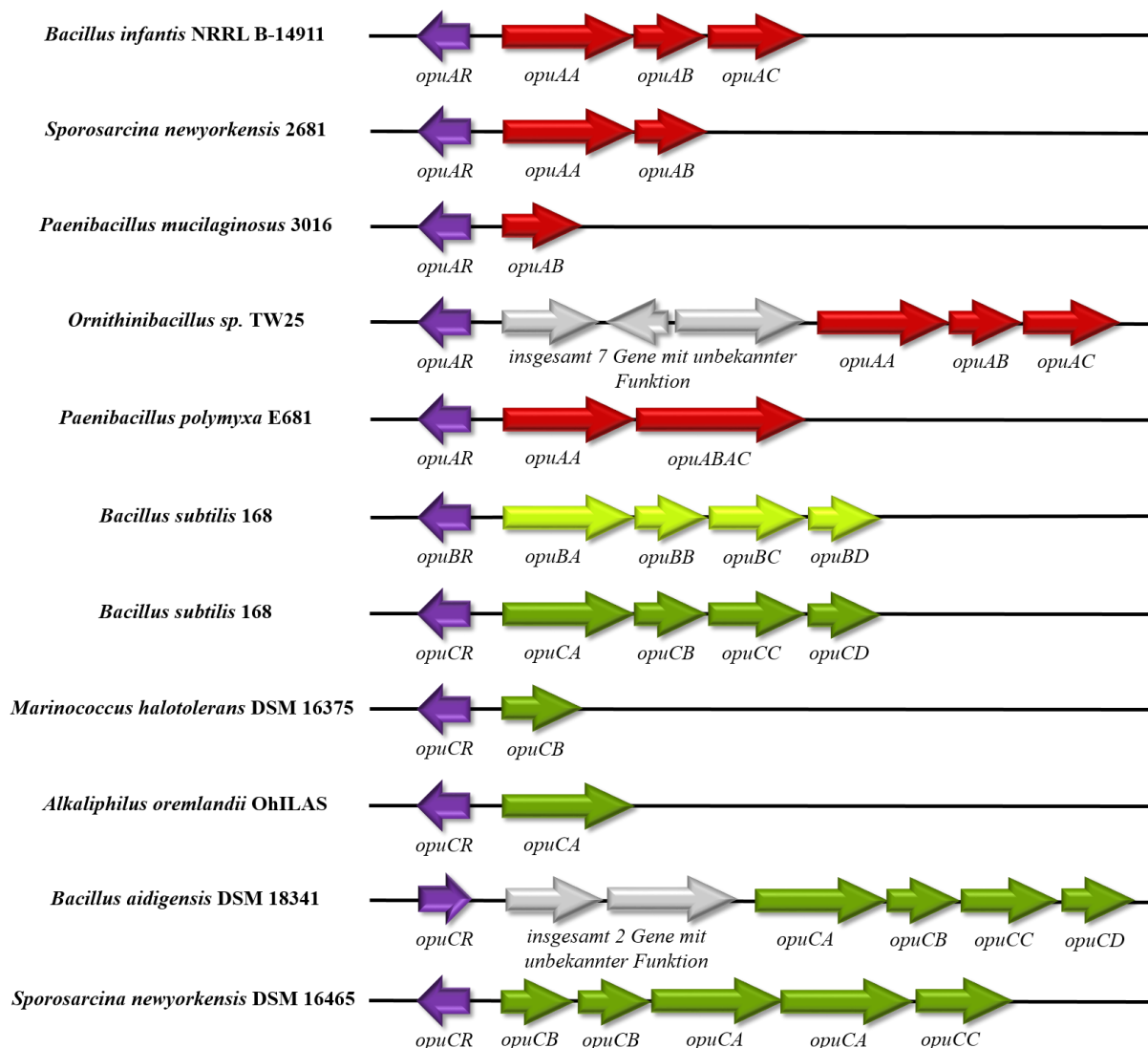


Abbildung 19: Genetische Organisation verschiedener *gbsR* Genumgebungen der Transporter-Klasse.

Schematische Auflistung unterschiedlicher Variationen der angrenzenden Opu-Transporter aus verschiedenen Bakterienstämmen. Es wurde exemplarisch nur ein Vertreter jeder möglichen Genclusteranordnung beispielhaft abgebildet.

4.1.3 Die Osmo-unabhängige Klasse

Die zweite Gruppe wird als Osmo-unabhängige-Klasse bezeichnet, da kein einziges Gen, für einen kompatiblen Solute Transporter oder Gene für die Glycin Betain Synthese, neben einem der *gbsR* ähnlichen Genen vorhanden ist. Lediglich bei fünf *gbsR* Genen dieser Klasse wurde in der Nähe oder angrenzend ein ABC-Transporter für Eisen(III)zitat bzw. ein Transporter mit der Annotation "verwandter ABC-Transporter" gefunden. Hervorstechend in dieser Klasse ist allerdings, dass, im Gegensatz zu den beiden anderen Klassen, *gbsR* ähnliche Gene nur insgesamt zwei *Firmicuten* zu finden sind.

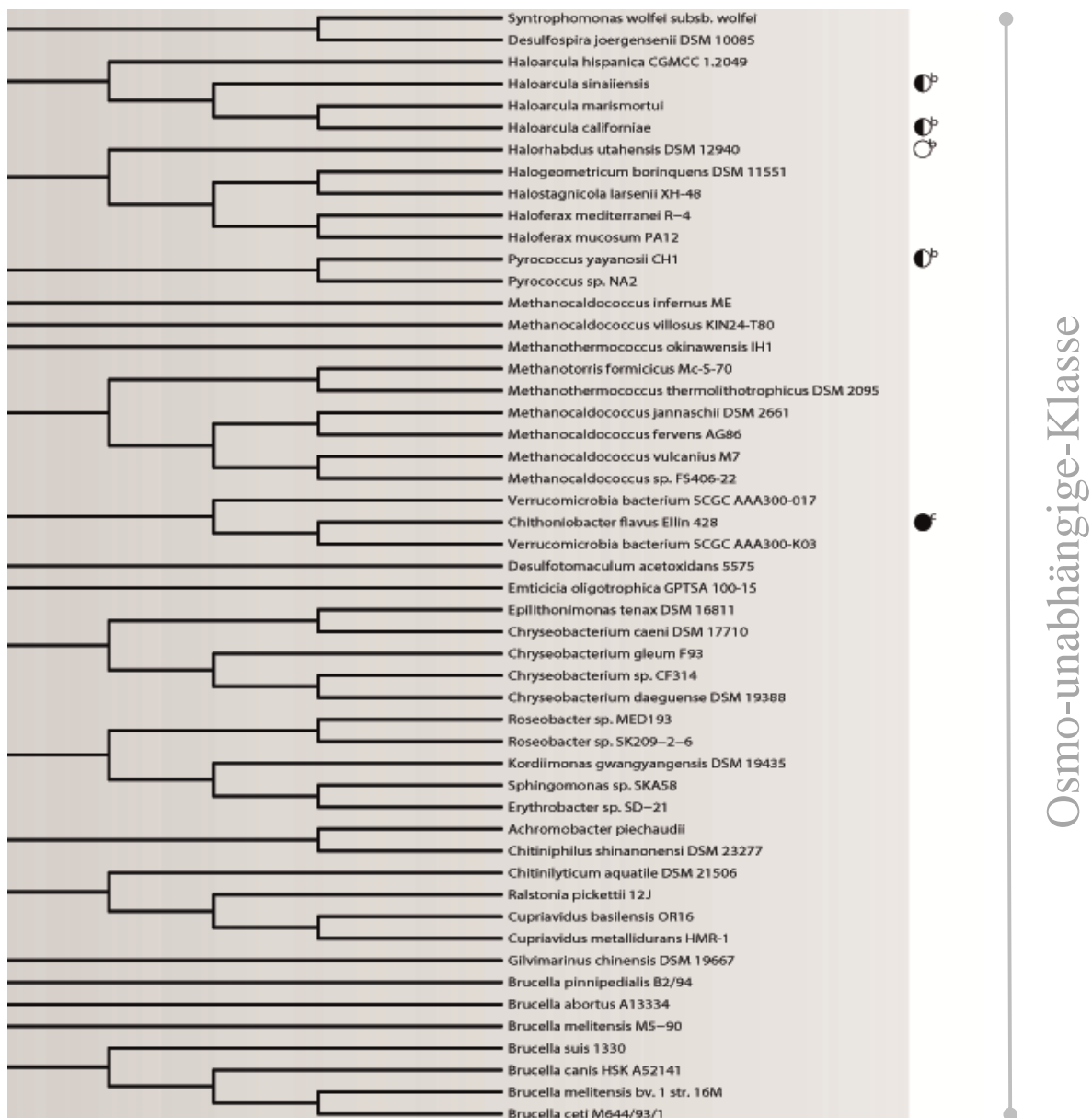


Abbildung 20: Verbreitung von *gbsR* ähnlichen Genen innerhalb der Osmo-unabhängigen-Klasse.

Zu sehen ist die Nahansicht der Osmo-unabhängigen-Klasse aus Abbildung 17. Schwarze Kreise stehen für osmomotisch unabhängige Transporter mit der Spezifität für ^aNatrium, ^bEisen(III)zitat, ^cABC-verwandt, ^dKohlenhydrat, ^e2-Aminoethylphosphat oder ^fMolybdat.

Von den insgesamt 51 Stämmen, die ein *gbsR* ähnliches Gen aufweisen, gehören 20 zur Domäne der *Archaea*, genauer der *Euryarchaeota*. Ebenfalls 20 Stämme zählen zum Phylum der *Proteobacteria*, sechs zu den *Bacteroidetes* und drei zu den *Verrucomicrobia*. Der einzige für diese Arbeit relevante Vertreter ist das GbsR Homolog Mj223 aus *Methanococcus janaschii* DSM 2661 (Ray *et al.*, 2003). Anhand der von Mj223 gelösten Kristallstruktur konnte ein Modell der Kristallstruktur von GbsR aus *B. subtilis* erstellt werden (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Da Mj223 vielleicht für die Regulation von Antibiotika-Resistenzgenen zuständig ist (Ray *et al.*, 2003), ist es für die osmotische Regulation nicht von Bedeutung. Die fehlende osmotische Relevanz trifft vermutlich für alle GbsR-Typ Regulatoren in dieser Klasse zu.

4.1.4 Die Synthese-Klasse

Die dritte Klasse besteht mit einer Ausnahme (*Halmonas jeotgali* Hwa) ebenfalls ausschließlich aus Stämmen des Phylums *Firmicutes* (siehe Abbildungen 16 & 17). Sie wird als Synthese-Klasse bezeichnet, da angrenzenden an das *gbsR* bei 65 Stämmen ein vollständiges Glycin Betain Synthese Gencluster vorzufinden ist. Insgesamt gibt es in dieser Klasse 90 *gbsR* Gene.

An letzter Position des Stammbaums zu finden ist das *gbsR* Gen aus *B. subtilis* dessen Aminosäuresequenz die Grundlage dieses Stammbaums ist. Wie schon erwähnt, befinden sich neben dem charakterisierten Repressor auf dem Genom bereits analysierte Glycin Betain Synthese Gene, deren Expression durch GbsR reguliert wird (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Diese Genanordnung ist angrenzend an 36 *gbsR* Gene dieser Klasse genau so vorzufinden wie für *B. subtilis* beschrieben (Abbildung 22). Vereinzelt tauchen einige Stämme auf, bei denen nur das Gen für die Glycin Betain Aldehyd Dehydrogenase (*gbsA*) des *gbsAB*-Operon zu finden ist. Neben *Halobacillus* sp. BAB-2008 ist das in *Bacillus cereus* VD045 der Fall. Auch *Salsuginibacillus kocurii* DSM 18087 besitzt auf dem Genom antilinear zu *gbsR* nur ein weiteres Gen (*gbsA*). Besonders ist hier allerdings die Anordnung, da es als einziges *gbsA*-Gen stromabwärts vom *gbsR* liegt.

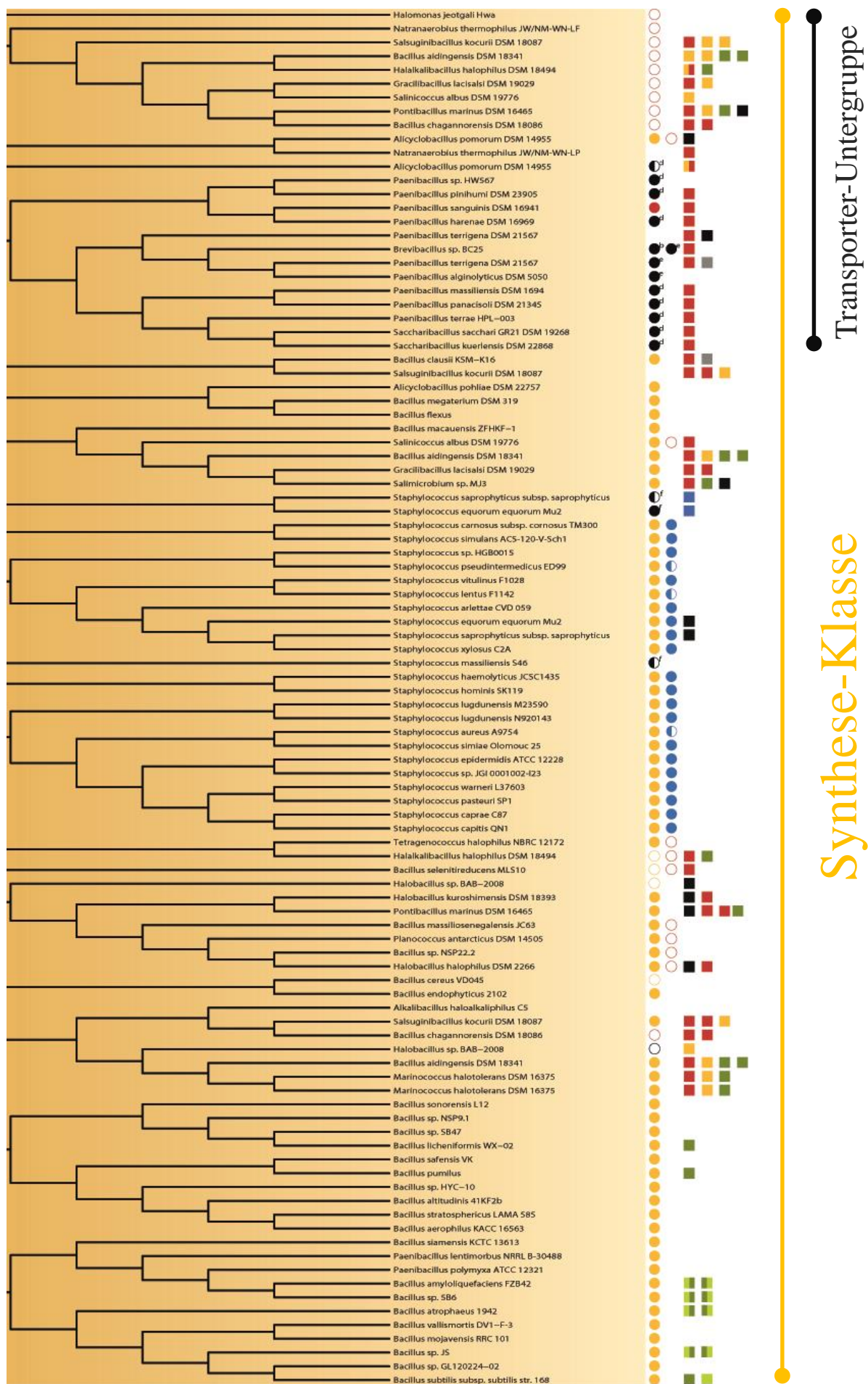


Abbildung 21: Verbreitung von *gbsR* ähnlichen Genen innerhalb der Synthese-Klasse.

Zu sehen ist die Nahansicht der Synthese-Klasse aus Abbildung 17. Innerhalb der Synthese-Klasse ist eine kleine Transporter-Untergruppe vorzufinden. Die verschieden farbigen Kreise zeigen an, welche Art von Operon angrenzend an das *gbsR* ähnliche Gen im Genom vorhanden ist. (●) entsprechen *opuA*-Operonen, (●) *gbsAB*-Operonen und (●) *opuD*-Genen wie sie aus *B. subtilis* bekannt sind. Die schwarzen Kreise stehen für osmotisch-unabhängige Transporter mit der Spezifität für ^aNatrium, ^bEisen(III)zitat, ^cABC-verwandt, ^dKohlenhydrat, ^e2-Aminoethylphosphat oder ^fMolybdat. Sind die Kreise nicht ausgemalt, zeigt dies an, dass sich kein vollständiges Operon neben dem *gbsR* ähnlichen befindet. Sind sie nur halb gefüllt, befindet sich das Operon nicht unmittelbar neben dem *gbsR* ähnlichen Gen. Die symbolischen Quadrate zeigen an, ob es im selben Bakterium weitere *gbsR* Gene gibt. (■) entsprechen *opuA*-Operonen, (■) *opuB*-Operonen, (■) *opuC*-Operonen, (■) *gbsAB*-Operonen wie sie aus *B. subtilis* bekannt sind. (■) zeigen Gene an, die für osmotisch-unabhängige Transporter kodieren.

Ebenfalls als Glycin Betain Synthesecuster bestätigt, ist das *gbsAB*-Operon aus *Halobacillus halophilus* DSM 2266. Zusätzlich zum Operon taucht in diesem Gencluster noch ein ATP Bindeprotein ähnlich zum *opuAA* aus *B. subtilis* auf, wie Abbildung 22 entnommen werden kann. Das *opuAA* Gen liegt hier auf derselben mRNA wie der putative Regulator. Diese Genanordnung ist noch in folgenden weiteren Bakterien zu finden: *Bacillus sp.* NSP22.2, *Planococcus antarcticus* DSM 14505, *Bacillus massiliosenegalensis* JC6, *Tetragenococcus halophilus* NBRC 12172 und *Alicyclobacillus pomorum* DSM 14955. Auch in *Haloalkalibacillus halophilus* DSM 18494 und *Bacillus selenitireducens* MLS10 ist diese genetische Anordnung zu finden. Ihnen fehlt allerdings die Cholin Dehydrogenase (*gbsB*).

Besonders auffällig im Stammbaum ist, dass alle vorhandenen *Staphylococci* ausschließlich in der Synthese-Klasse auftauchen. Mit Ausnahme des Stammes *S. massiliensis* S46 weisen die übrigen 22 *Staphylococci* eine nahezu identische Genumgebung des *gbsR*s auf. Stellvertretend für alle *Staphylococci* ist das vollständige Gencluster für *S. xylosus* C2A in Abbildung 22 zu sehen. Wie für *Bacillus subtilis* und *Halobacillus halophilus* DSM 2266 wurde die Funktion der Glycin Betain Synthese Gene für diesen *S. xylosus* C2A bestätigt. Zusätzlich zu den Genen, die für die Glycin Betain Synthese kodieren, konnte ein BCCT-Typ Transporter, spezifisch für Cholin, identifiziert werden (Rosenstein *et al.*, 1999). Das Gen befindet sich antilinear, stromabwärts vom *gbsR*. Außer bei den drei *Staphylococci* *S. pseudintermedius* ED99, *S. lentus* F1142 und *S. aureus* A9754 befindet sich das Gen für den BCCT-Typ Transporter direkt angrenzend am *gbsR*. Bei den drei aufgelisteten Stämmen liegt jeweils ein weiteres Gen mit unbekannter Funktion dazwischen.

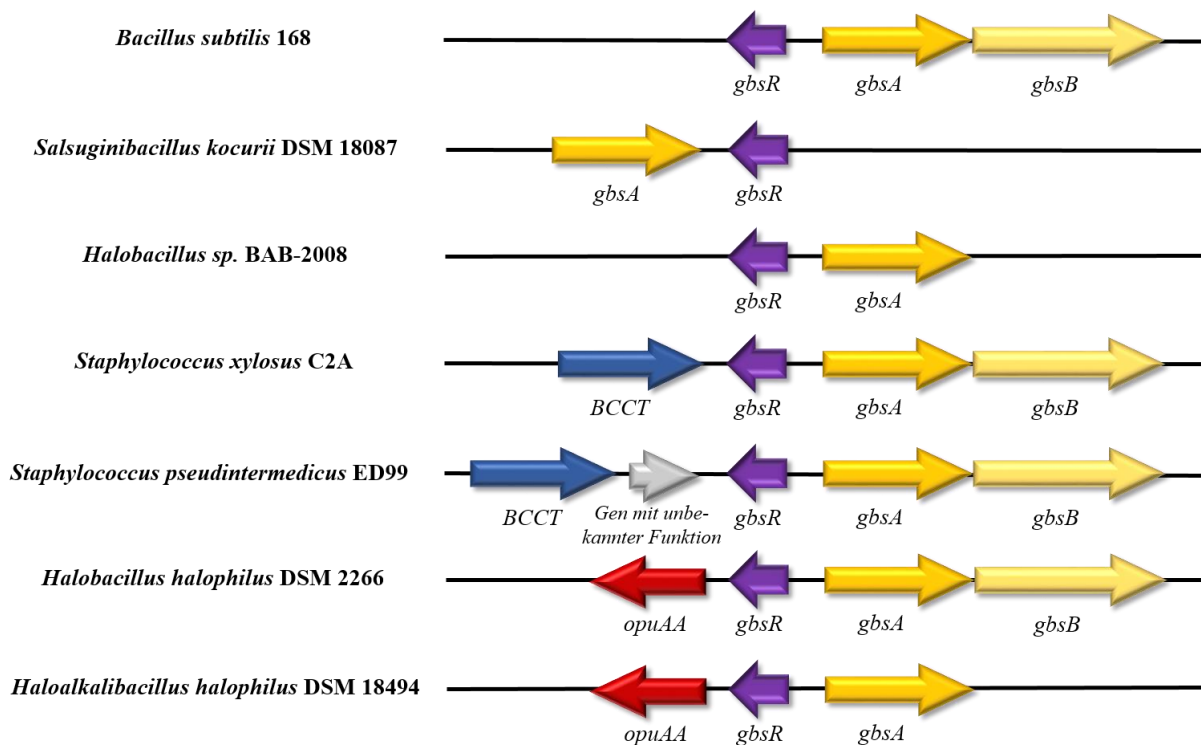


Abbildung 22: Genetische Organisation verschiedener *gbsR* Genumgebungen der Synthese-Klasse.

Schematische Auflistung unterschiedlicher Variationen der angrenzenden Glycin Betain Synthese Gene und möglicher Transporter aus verschiedenen Bakterienstämmen. Es wurde exemplarisch nur ein Vertreter jeder möglichen genetischen Anordnung beispielhaft abgebildet.

Neben den Glycin Betain Synthese Genen sind im oberen Teil des Stammbaums dieser Klasse 23 *gbsR* ähnliche Gene mit angrenzendem annotiertem ABC-Transporter zu finden (Abbildungen 17 & 21). Diese Transporter-Operone sind zum Teil allerdings nicht vollständig vorhanden oder transportieren nicht spezifisch kompatible Solute. Laut der Annotation der Internetseite JGI (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi>) transportieren 13 dieser Transporter Kohlenhydrate, 2-Aminoethylphosphat oder Eisen(III)zitat. Bei den nicht vollständig vorhandenen Operonen handelt es sich jeweils um ein annotiertes ATP Bindeprotein eines OpuA-Typ Transporters wie er aus *B. subtilis* bekannt ist. Da besonders diese Transporter osmotisch relevant sein können, werden sie nicht der Osmotisch-unabhängigen-Klasse zugeordnet. Da die *gbsR* ähnlichen Gene neben diesen Transportern eine höhere Identität zu den *gbsR* Genen der Synthese-Klasse zeigen, als zur Transporter-Klasse, werden alle diese 23 *gbsR* ähnlichen Gene in eine kleine Transporter-Untergruppe innerhalb der Synthese-Klasse unterteilt (Abbildung 21). Im Folgenden wird allerdings nicht weiter auf diese Gene eingegangen. Dennoch sollten diese Transporter in näherer Zukunft auf ihre Funktion und ihre osmotische Relevanz hin untersucht werden.

4.1.5 Verbreitung der GbsR-Typ Regulatoren innerhalb eines Bakteriums

Wie bereits in der Einleitung des Kapitels 4.1 erwähnt, kommt es mehrfach vor, dass in einem Bakterium mehrere GbsR-Typ Regulatoren vorkommen. Dies können wie in den beiden Stämmen *Bacillus ainingensis* DSM 18341 und *Pontibacillus marinus* DSM 16465 bis zu fünf *gbsR* ähnliche Gene sein. Insgesamt gibt es 23 Stämme mit je zwei GbsR-Typ Regulatoren, zwölf Bakterien mit je drei *gbsRs*, drei mit vier *gbsR* ähnlichen Genen und letztlich 2 Bakterien, die fünf *gbsR* Homologe besitzen.

Es ist generell auffällig, dass es nur in den beiden osmotisch-abhängigen Klassen Organismen gibt, die mehrere GbsR-Typ Regulatoren aufweisen. In der Osmo-unabhängigen Klasse sind keine *Bacteria* oder *Archaea*, die mehr als einen GbsR-Typ Regulator besitzen. Oft ist es der Fall, dass ein Bakterium mehrere GbsR-Typ Regulatoren sowohl aus der Transporter- als auch aus der Synthese-Klasse besitzt. Besonders auffällig in der OpuB/OpuC-Untergruppe ist, dass es in fast allen vorhandenen Stämmen mindestens einen weiteren GbsR-Typ Regulator neben dem OpuBR oder OpuCR gibt. Dieses weitere *gbsR* ähnliche Gen stammt dann in 87 % der Fälle aus der Synthese-Klasse und besitzt angrenzende Glycin Betain Synthese Gene.

Auch *B. subtilis* selbst besitzt mehrere GbsR-Typ Regulatoren (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Zum einen GbsR selbst und zum anderen OpuBR und OpuCR. Während GbsR in der Synthese-Klasse zu finden ist, tauchen OpuBR und OpuCR in der Transporter-Klasse genauer in der OpuB/OpuC-Untergruppe auf. Dieses Muster ist in vier weiteren *Bacilli* zu finden. Dazu zählen *B. sp.* JS, *B. atrophaeus* 1942, *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *B. sp.* 5B6.

4.2 Das GbsR Bindemotiv in *B. subtilis*

4.2.1 Das GbsR Bindemotiv vor *gbsA* in *B. subtilis*

Der Cholin-sensitive Repressor GbsR aus *B. subtilis* ist für die Regulation der Genexpression der Glycin Betain Synthese Gene und der des OpuB-Transporters zuständig (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Durch die Bindung des GbsR Repressors an die DNA wird die Transkription inhibiert. Bisher wurde durch Oppen (2009) in vorläufigen EMSA Experimenten gezeigt, dass GbsR sowohl in der Promotorregion vor dem *gbsAB*-Operon, als auch vor dem *opuB*-Operon bindet. An welchen Basenabfolge GbsR genau bindet, ist bisher ungeklärt und soll im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden.

Mittels verschiedener *gbsA*-*treA*-Reporterfusionen soll geklärt werden, wo das GbsR Bindemotiv vor *gbsA* liegt. Die dabei verwendeten Stämme wurden in der von mir experimentell betreuten Bachelorarbeit von Schumann (2015) erzeugt. Erste Ergebnisse im

Rahmen dieser Bachelorarbeit deuteten darauf hin, dass es sich bei dem deletierten Bereich um das GbsR Bindemotiv vor *gbsA* handelt. Da es sich dabei jedoch um sehr vorläufige Experimente handelt, wurden die Stämme erneut mit allen notwendigen Kontrollen analysiert. Den Hinweis, welche Region als GbsR Bindemotiv in Frage kommt, wurde den bioinformatischen Analysen der Bachelorarbeit von Schumann (2015) und der Publikation von Leyn *et al.*, (2013) entnommen. Aus Tabelle 11 kann eine Auflistung der genutzten Stämme und deren genauer Mutation im Promotorbereich entnommen werden. Neben dem von Leyn *et al.* (2013) und Schumann (2015) *in silico* identifizierte Bindemotiv wurde zusätzlich der von Nau-Wagner *et al.* (2012) vorhergesagte Bereich erneut geprüft. Die Beschreibung der Durchführung ist in Kapitel 3.5.2 zu finden. Dabei wurde sich das Expressionslevel zum einen ohne Salz und kompatibles Solut bei einer OD₅₇₈ von 0,25 (vor Induktion) angeschaut und zum anderen 90 Minuten nach der Zugabe von 0,4 M NaCl und 1 mM Cholin (nach Induktion). Anhand der photometrisch bestimmbaren Gelbfärbung kann die Expressionsstärke des *gbsA*-Promotors bestimmt werden. Die Gelbfärbung entsteht bei der Spaltung des Substrats pNPG durch das Enzym TreA. In den verwendeten Stämmen liegt kein intaktes *treA* Gen auf der chromosomalen DNA vor.

Tabelle 11: Übersicht aller *gbsA*-Promotorregion Mutationen

-10		Mutationsart & Position	RBS	<i>gbsA</i>	<i>gbsR</i>	Stamm- name	Beschreibung	
tgtagattaaggttg	ttaaaaac	attaaattttattttaacaaactttatttacgtcaaggaggcttat		atgagt	+	DHB4	Wildtyp mit eingezeichnetem <i>in silico</i> Bindemotiv nach Leyn <i>et al.</i> (2013)	
					-	DHB12		
tgtagattaaggttg	ttaaaaac	attaaattttattttaacaaagttcaaaat	 	acgtcaaggaggcttat	atgagt	+	AROB10	Mutationen im <i>in silico</i> vorherges. Binde- motiv nach Nau-Wagner <i>et al.</i> (2012)
					-	AROB5		
tgtagattaaggttg	ttaaaaaca	 Δ	ttttattttaacaaactttatttacgtcaaggaggcttat	atgagt	+	STHB78	Mutation 1	
					-	STHB85		
tgtagattaaggttg	ttaaaaac	attaaattttt  Δ	caaactttatttacgtcaaggaggcttat	atgagt	+	STHB79	Mutation 2	
					-	STHB86		
tgtagattaaggttg	ttaaaaac	attccctttttattttaacaaactttatttacgtcaaggaggcttat	atgagt	+	+	STHB80	Mutation 3	
					-	STHB87		
tgtagattaaggttg	ttaaaaac	attaaatttttagggtaacaaactttatttacgtcaaggaggcttat	atgagt	+	+	STHB81	Mutation 4	
					-	STHB88		
tgtagattaaggttg	ttaaaaaca	 Δ	caaactttatttacgtcaaggaggcttat	atgagt	+	STHB82	Mutation 5	
					-	STHB89		
tgtagattaaggttg	ttaaaaac	attaaattttttttttattttaacaaactttatttacgtcaaggaggcttat	atgagt	+	+	STHB83	Mutation 6	
					-	STHB90		
tgtagattaaggttg	ttaaaaac	attaaattt  Δ	tattttaacaaactttatttacgtcaaggaggcttat	atgagt	+	STHB84	Mutation 7	
					-	STHB91		

Wie zuvor von Nau-Wagner *et al.* (2012) gezeigt, ist GbsR ein Cholin-sensitiver Repressor. Dies konnte ebenfalls in dieser Arbeit bestätigt werden. Liegt keine Mutation im *gbsA*-Promotorbereich vor, ist in Anwesenheit von GbsR keine Expression vor und nur eine moderate nach Induktion mit Salz und Cholin, anhand der TreA-Aktivität, zu erkennen. In

Abwesenheit von GbsR ist in beiden Fällen eine deutliche und gleich starke Expression vorhanden (Abbildung 23).

Die Basenmutationen, im von Nau-Wagner *et al.* (2012) als GbsR Bindemotiv vorher gesagten Bereich, haben wie von Dr. T. Hoffmann (unveröffentlichte Daten) zuvor gesehen, keine Auswirkung auf das Bindeverhalten. Die Daten dieser Mutante zeigen das gleiche Expressionsmuster für *gbsA* wie für den Wildtyp-Stamm (Abbildung 23).

Bei allen Mutationsstämmen, bei denen das von Leyn *et al.* (2013) und Schumann (2015) *in silico* vorhergesagte Bindemotiv in irgendeiner Weise verändert oder zerstört wurde, ist keine Repression in Anwesenheit von GbsR zu sehen. GbsR scheint seinen Einfluss vollständig verloren zu haben, da die TreA-Aktivität aller Mutantenstämme nach der Induktion mit Salz und Cholin auf demselben Niveau ist, wie die des Wildtyps ohne GbsR (Abbildung 23). Auffällig in Abwesenheit von GbsR ist, dass alle Mutanten nach der Induktion mit Salz und Cholin eine ~25 %ig erhöhte TreA-Aktivität aufweisen. Während vor der Induktion die TreA-Aktivität bei circa 200 U/mg Protein liegt, steigt sie nach der Induktion im Durchschnitt auf 250 U/mg Protein an. Dies kann für den Stamm ohne Mutation im *gbsA*-Promotorbereich nicht beobachtet werden. Hier ist die *gbsA*-Expression vor sowie nach der Induktion gleich stark (Abbildung 23). Möglicherweise hat Cholin in Abwesenheit des Bindemotivs einen topologischen Effekt auf die DNA, so dass die Transkription etwas verstärkt ablaufen kann. Dass sich erhöhte Osmolarität und einige kompatible Solute auf die Stärke und Art des Supercoilings der DNA auswirken, konnte bereits beobachtet werden (Krispin & Allmansberger, 1995; Spiegelhalter & Bremer, 1998).

Anhand der unterschiedlichen TreA-Aktivitäten der einzelnen Mutanten kann eine erste Ableitung der wichtigen Bereiche im entdeckten Bindemotiv gemacht werden. Da in Anwesenheit von GbsR alle Mutationen einen deutlichen Einfluss auf die *gbsA*-Expression haben, ist der ganze, als Bindemotiv definierte Bereich, für die Bindung des GbsRs essentiell. Besonders wichtige Basenpaare scheinen im linken Teils des *in silico* bestimmten Palindroms (Tabelle 11, Mutation 1) zu liegen, da hier die deutlichste TreA-Aktivität-Differenz zum Wildtyp vorliegt. Eine Substitution der drei Adenine zu Cytosinen in genau dieser Region hat jedoch die geringsten Auswirkungen aller Mutationen (Tabelle 11, Mutation 3) im Vergleich zum Wildtyp. Die Spezifität der Basen scheint nur einen begrenzten Einfluss zu haben. Scheinbar ist der Abstand der entscheidenden Basen bei der Bindung an die DNA von GbsR sehr wichtig. Dafür würde auch der Effekt der Insertion bzw. Deletion zweier Thymine im mittleren Bereich des Motivs sprechen (Tabelle 11, Mutation 6 & 7).

Mit welchen Basen GbsR in diesem Bereich im Detail in Interaktion tritt, kann anhand dieses Enzymassays nicht genau geklärt werden. Dass GbsR aus *B. subtilis* in dieser 16 Basenpaar langen Region bindet, ist hiermit aber klar gezeigt. Da das GbsR Bindemotiv stromabwärts der -35 und -10 Region liegt, handelt es sich bei GbsR um einen Reprssor, der bei der Kontrolle der *gbsAB*-Expression wie ein "road block" für das Fortschreiten der RNA-Polymerase fungiert.

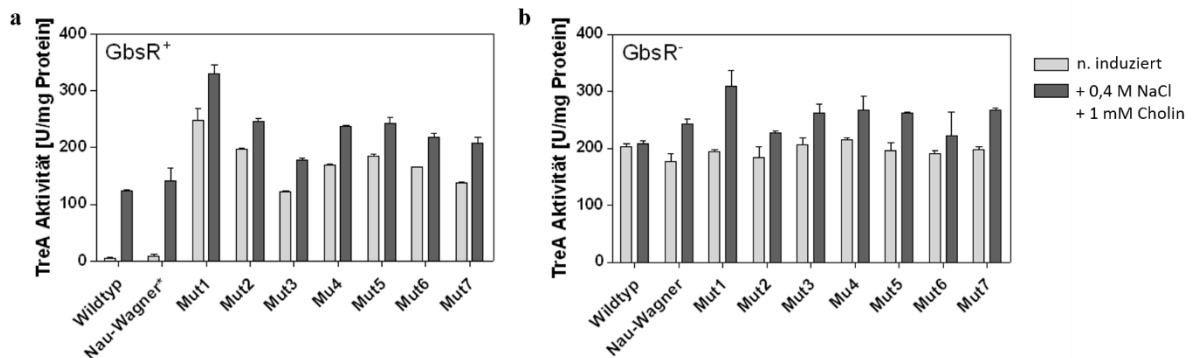


Abbildung 23: TreA Messungen der *gbsA*-Promotorregion Mutanten.

Im Diagramm dargestellt ist die Genexpression des *gbsA'-treA*-Reportergens in *B. subtilis* mit verschiedenen Mutationen im Promotorbereich von *gbsA*. Bei den Mutationen 1, 2, 5 und 7 handelt es sich um unterschiedlich große Deletionen im putativen GbsR Bindemotiv, dass von Leyn *et al.* (2013) und Schumann (2015) bioinformatisch ermittelt wurde. Bei den Mutationen 3,4 und 6 handelt es sich um verschiedene Substitutionen, die ebenfalls in diesem Bereich liegen. Bei "Nau-Wagner" handelt es sich um die Substitution von vier Basen, die in dem von Nau-Wagner *et al.* (2012) als GbsR Bindemotiv vorhergesagten Bereich liegen. (a) zeigt die jeweilige *gbsA'-treA*-Genexpression mit GbsR und (b) in Abwesenheit von GbsR.

4.2.2 Das GbsR Bindemotiv vor *opuBA* in *B. subtilis*

GbsR reguliert neben dem *gbsAB*-Operon auch die kodierenden Gene für den Cholin-spezifischen Transporter OpuB in *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Aus diesem Grund wurde auch vor dem *opuB*-Operon nach einem Bindemotiv für GbsR gesucht, das der identifizierten Region vor *gbsA* gleicht. Dafür wird zunächst ein Sequenzvergleich (3.6) eines Teils der intergenen Region vor *opuBA* und *gbsA* aus *B. subtilis* angefertigt.

Aus dem Sequenzvergleich geht hervor, dass ebenfalls vor *opuBA* ein mögliches GbsR Bindemotiv liegt. Analog zum geprüften GbsR Motiv vor *gbsA*, ist eine sehr ähnliche Region vor *opuBA* zu finden. Die beiden Sequenzen unterscheiden sich lediglich in insgesamt vier Basen, die in Abbildung 24 mit einem * markiert sind. Der zuvor als essentiell annotierte Bereich des Bindemotivs von GbsR (-TTAAAT-), bei dem eine Deletion die stärkste Auswirkung zeigte (4.2.1, Mutation 1), liegt bei beiden identisch vor. Zudem scheint der identische Bereich etwas über das in dieser Arbeit definierten GbsR Bindemotiv vor *gbsA* hinaus zu gehen (Abbildung 24).

Das GbsR Bindemotiv scheint demnach vor *opuBA* genau wie vor *gbsA* so zu liegen, dass GbsR bei der Genexpression als ein "road block" für das Fortfahren der RNA-Polymerase fungiert. Wird angenommen, dass sich das GbsR Bindemotiv tatsächlich an dieser *in silico* vorhergesagten Position befindet, gibt es insgesamt zwei GbsR-Typ Regulator Bindemotive vor *opuBA* (Abbildung 24). Zum einen das Bindemotiv für GbsR und zum anderen das etwas stromaufwärts liegende, von Lee *et al.* (2013) ermittelte, Bindemotiv von OpuCR.

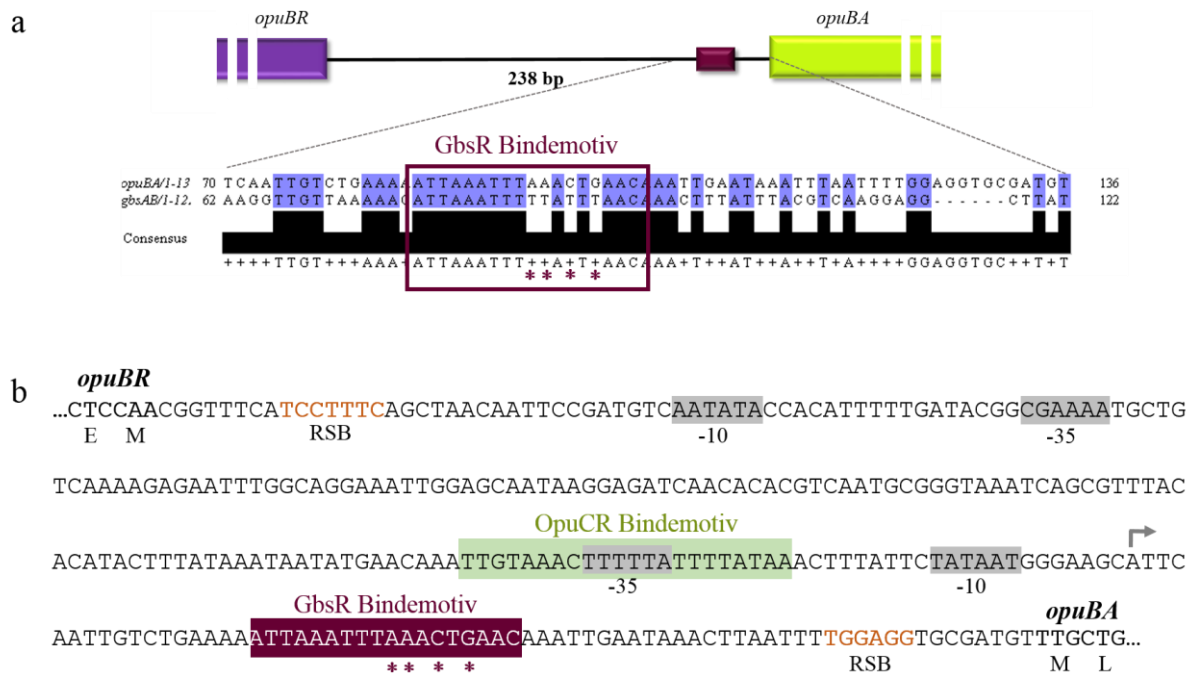


Abbildung 24: Lage der Bindemotive von GbsR und OpuCR vor *gbsA* und *opuBA* in *B. subtilis*.

(a) Dargestellt ist der Sequenzvergleich der intergenen Region ~60 bp vor *gbsA* und *opuBA*. Eingezeichnet ist der in dieser Arbeit ermittelte Bereich des GbsR Bindemotivs vor *gbsA*, der auch vor *opuBA* zum größten Teil konserviert ist. Er unterscheidet sich lediglich in vier Basenpaaren, die mit einem * gekennzeichnet sind. (b) zeigt die gesamte interene Region zwischen *opuBR* und *opuBA*. Hier eingezeichnet ist in weinrot das GbsR Bindemotiv und in hellgrün das OpuCR Bindemotiv nach Lee *et al.* (2013). Die mit * markierten Basen weisen im GbsR Bindemotiv vor *gbsA* unterschiedliche Basenpaare auf. Demnach überschneiden die Bindemotive der GbsR-Typ Regulatoren sich nicht. GbsR fungiert folglich auch vor *opuBA* als ein "road block" für das Fortschreiten der RNA-Polymerase bei der Genexpression.

4.3 *In silico* Bindemotiv der GbsR-Typ Regulatoren der Synthese-Klasse

Es konnte bisher gezeigt werden, dass GbsR an ein spezifisches Bindemotiv an die DNA vor dem genomisch angrenzenden *gbsAB*-Operon bindet. Im Folgenden soll zunächst *in silico* geklärt werde, ob dies für weitere GbsR-Typ Regulatoren, aus der in dieser Arbeit definierten Synthese-Klasse, der Fall ist. Dafür wird in einem Aminosäuresequenzvergleich (3.6) aller

GbsRs mit angrenzendem putativen *gbsAB*-Operon geschaut, ob ein Winged-Helix-Motiv ähnlich zu dem von GbsR aus *B. subtilis* vorhanden ist.

Dem Aminosäuresequenzvergleich (Abbildung 55; Anhang) aller GbsR-Typ Regulatoren der Synthese-Klasse mit angrenzenden Glycin Betain Synthesegenen kann entnommen werden, dass sie im N-terminalen Bereich eine konservierte Region haben. Hierbei scheint es sich, wie bei GbsR aus *B. subtilis*, um das Winged-Helix-Motiv zu handeln, das zur Bindung an die DNA benötigt wird. Generell scheinen folglich alle GbsR-Typ Regulatoren in der Lage zu sein an DNA zu binden.

Da bei allen analysierten GbsR-Typ Regulatoren im Sequenzvergleich eine hohe Ähnlichkeit zum 28 Aminosäure langen Winged-Helix-Motiv von GbsR aus *B. subtilis* besteht, wird davon ausgegangen, dass auch das Bindemotiv an das gebunden wird, konserviert ist. Für die im Stammbaum vorhandenen *Bacilli* der Synthese-Klasse wurde dies bereits von Schumann (2015) überprüft und bestätigt. Nun wird dies für die verbleibenden *Staphylococci* in einem weiteren Sequenzvergleich analysiert. Hierfür wurden alle *gbsA*-Promotorregionen der zuvor angeschauten GbsR-Typ Regulatoren aus *Staphylococci* verwendet (3.6).

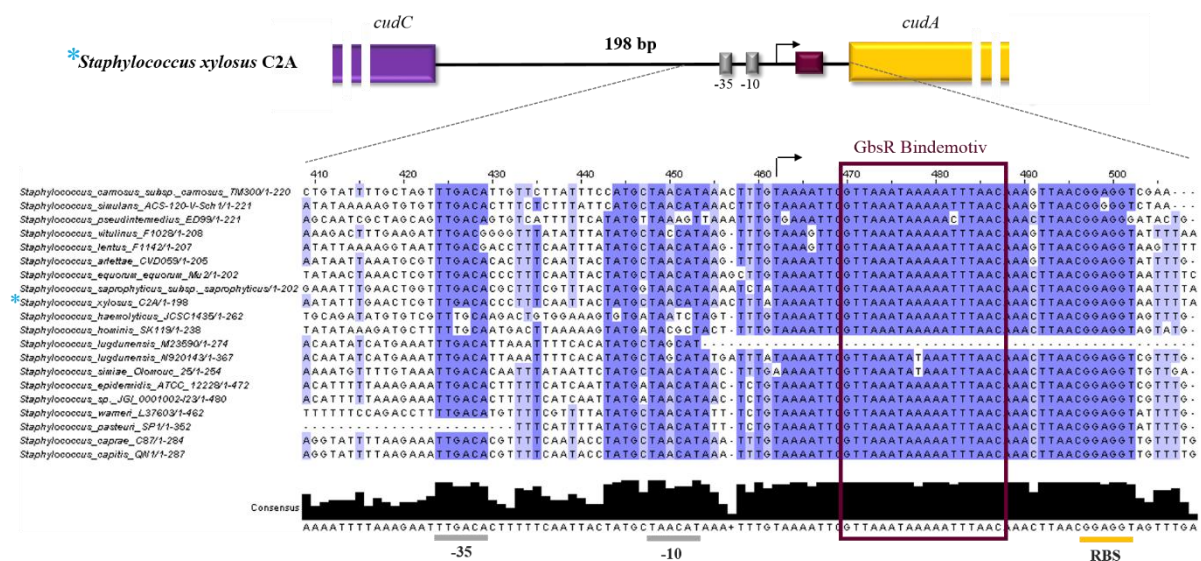


Abbildung 25: Ausschnitt des Sequenzvergleichs der Promotorregion mit GbsR Bindemotiv in *Staphylococci*.

Der Bereich ist schematisch anhand der Promotorregion aus *S. xylosus* C2A dargestellt. Die -35 Region sowie die -10 Region, der Transkriptionsstart (Pfeil) und die Ribosomenbindestelle (orange) sind nach Rosenstein *et al.* (1999) eingezeichnet. Außerdem ist das für GbsR zuvor detektierte Bindemotiv eingezeichnet, was sich ebenfalls vor fast allen *gbsA*- (*cudA*-) Genen befindet.

Aus dem Sequenzvergleich aller *gbsA*-Promotorregionen der vorhandenen *Staphylococci* geht hervor, dass spezifisch der Bereich (~90 bp) direkt vor den *gbsA* hoch konserviert ist (Abbildung 56; Anhang). Der Promotor des *cudA* (\approx *gbsA*) aus *S. xylosus* C2A wurde bereits

GbsR-Typ Regulatoren aus den *Staphylococci*-Stämmen die Expression des angrenzenden *gbsAB*-Operons durch Bindung der DNA reguliert, wie es bereits für GbsR aus *B. subtilis* bekannt ist (4.2.1). Die Glycin Betain Synthesegene (*cudAB*) aus dem Stamm *S. xylosus* C2A, die ebenfalls neben einem *gbsR* ähnlichen Gen (*cudC*) liegen, sind bereits näher charakterisiert (Rosenstein *et al.*, 1999). Vermutlich reguliert CudC sogar die Genexpression des benachbarten *gbsAB*-Operon auf die gleiche Art und Weise wie GbsR aus *B. subtilis*. Ist das der Fall, so müsste auch CudC aus *S. xylosus* C2A Cholin binden. Um dies nachzuweisen, wird CudC zunächst überproduziert (3.5.3) und via Strep-Tag® Affinitätschromatographie gereinigt und in 10 mM Tris pH 7,5 umgepuffert (3.5.6). Der eigentliche Nachweis erfolgt über eine fluoreszenzspektroskopische Messung. Dabei wird vorgegangen, wie es in Kapitel 3.5.10 beschrieben ist. Neben Cholin wird auch überprüft, ob CudC aus *S. xylosus* C2A wider Erwarten Glycin Betain binden kann.

Die entstanden Daten stammen aus dem von mir betreuten Praktikum der Erasmus Studentin Aneta Żelazo.

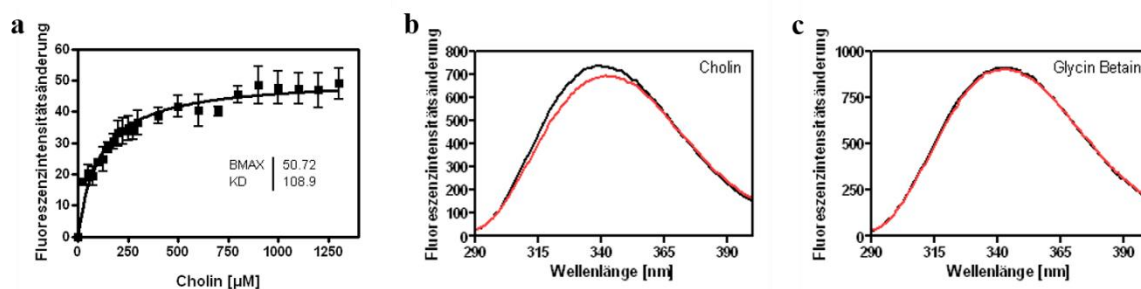


Abbildung 27: Fluoreszenzspektroskopische Messungen von CudC aus *S. xylosus*.

Gezeigt ist die Sättigungskurve (a) sowie das Fluoreszenzspektrum (b) mit Cholin und (c) Glycin Betain. CudC bindet Cholin mit einer K_D von $109 \mu\text{M} \pm 15,7 \mu\text{M}$. Glycin Betain wird nicht gebunden. Die Fluoreszenzintensität ist in schwarz ohne und in rot mit 1,3 mM kompatibles Solut über einen Wellenlängenbereich von 290 nm bis 400 nm angezeigt.

Wie zu erwarten war, bindet CudC aus *S. xylosus* C2A Cholin (Abbildung 27 (a)). Die Bindeaffinität beträgt eine K_D von $109 \mu\text{M} \pm 15,7 \mu\text{M}$. Sie konnte anhand der Michaelis-Menten Kurve ermittelt werden. Auch für GbsR konnte eine ähnlich starke Bindung zum Liganden Cholin mit dieser Methode ermittelt werden. Die K_D von GbsR aus *B. subtilis* zu Cholin beträgt $165 \mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$.

Für CudC aus *S. xylosus* C2A ist keine Fluoreszenzintensitätsänderung nach Zugabe von 1 mM Glycin Betain zu sehen (Abbildung 27 (c)). Das Protein scheint Glycin Betain nicht binden zu können. Zumindest ist die Bindung anhand dieser indirekten Methode nicht nachweisbar. Auch dieses Ergebnis war zu erwarten, da auch für GbsR aus *B. subtilis* mit Hilfe dieser Methode

keine Bindung des kompatiblen Soluts Glycin Betain durch GbsR nachgewiesen werden konnte.

4.5 Das GbsR-Typ Bindemotiv der OpuB/OpuC-Untergruppe

Neben GbsR aus *B. subtilis* ist noch von einem weiteren GbsR-Typ Regulator aus *B. subtilis* bekannt, dass er die Genexpression des angrenzenden Operons reprimiert. Die Rede ist hier von OpuCR, das für die Regulation des *opuC*-Operons, aber auch für die des *opuB*-Operons, zuständig ist (Lee *et al.*, 2013). Das *opuC*-Operon kodiert für den ABC-Transporter mit einem weiten Spektrum für kompatible Solute in *B. subtilis*. Aufgrund seiner genomischen Lage und der regulatorischen Zuständigkeit des Transporters wird OpuCR, im Gegensatz zum GbsR selbst, zur hier definierten Transporter-Klasse gezählt. Im Folgenden soll aufgedeckt werden, ob auch alle GbsR-Typ Regulatoren der Transporter-Klasse, in der Lage sind an die jeweils angrenzende Promotorregion zu binden. Für den stellvertretender GbsR-Typ Regulator der OpuB/OpuC-Untergruppe wurde die direkte Bindung von OpuCR an die *opuC*-Promotorregion bereits gezeigt (Lee *et al.*, 2013). Nun soll *in silico* überprüft werden, ob das bereits gefundene OpuCR Bindemotiv vor allen *opuBA*- bzw. *opuCA*-Genen dieser Untergruppe vorhanden ist. Auch hierfür wird zunächst ein Sequenzvergleich aller *opuBA*- und *opuCA*-Promotorregionen angefertigt, bei denen das *gbsR*-Homolog direkt angrenzt (3.6).

Die komplette Promotorregion vor *opuBA* und *opuCA* ist generell in den einzelnen Bakterien konserviert (Abbildung 57; Anhang). Am deutlichsten hebt sich allerdings der Bereich um die -35 Region der jeweiligen Promotorregion hervor, die ausgehend von dem identifizierten SigA Promotor von *opuB* aus *B. subtilis* (Kappes *et al.*, 1999) auf die übrigen Promotoren übertragen wurde. Demnach umfasst das nach Lee *et al.* (2013) und Leyn *et al.* (2013) bestimmte OpuCR Bindemotiv genau die -35 Region und verhindert somit das Aufsetzen der RNA-Polymerase auf die DNA. Das OpuCR Bindemotiv scheint durch die klare Konservierung entlag dieses Bereiches vor allen *opuB* bzw. *opuC*-Operonen vorhanden zu sein (Abbildung 28).

Für die Interaktion zwischen Regulator und DNA benötigt ein Regulator ein Helix-Turn-Helix Motiv. Für OpuCR aus *B. subtilis* wurde das Winged-Helix-Motiv im Bereich der Aminosäure 47 bis 68 (Lee *et al.*, 2013) bereit festgelegt. Es wird im Folgenden überprüft, ob auch die anderen GbsR-Typ Regulatoren der Transporter-Klasse ein mögliches Winged-Helix-Motiv aufweisen. Dies wird in einem Vergleich der Aminosäuresequenzen überprüft (3.6).

Das Winged-Helix-Motiv ist nur teilweise in den anderen GbsR-Typ Regulatoren konserviert. Dennoch liegen einige Merkmale identisch zum Winged-Helix-Motiv von OpuCR aus *B. subtilis* vor (Abbildung 58; Anhang). Auffällig ist, dass ein Teil des Motivs tatsächlich unter allen GbsR-Typ Regulatoren der Transporter-Klasse konserviert ist. Andere Bereiche scheinen meist nur innerhalb bestimmter Gruppen von Bakterien konserviert zu sein.

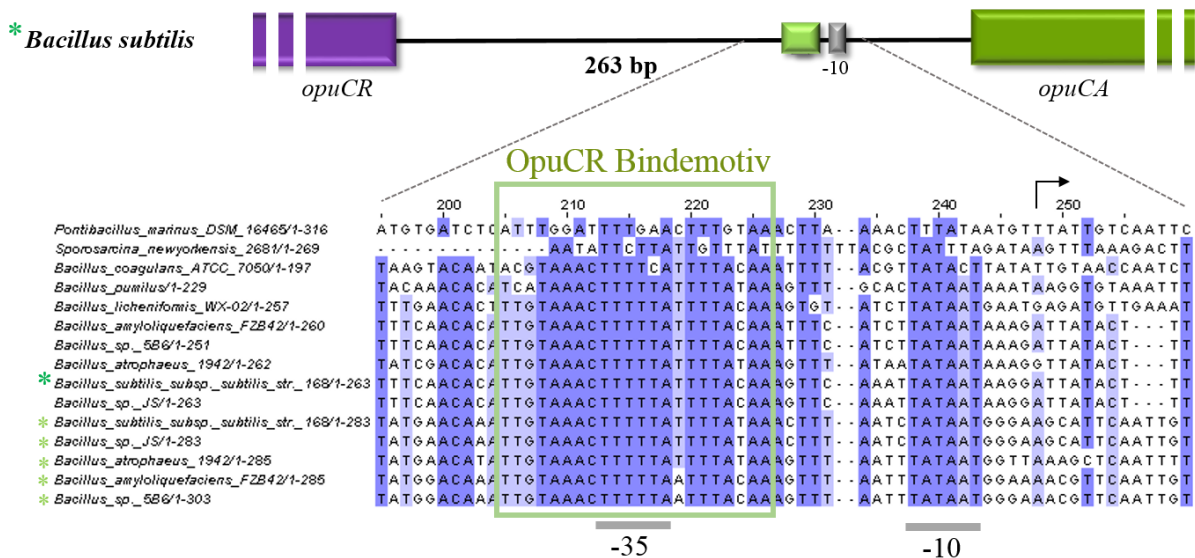


Abbildung 28: OpuBA- und opuCA-Promotorregionen mit OpuCR Bindemotiv.

Dargestellt ist ein Ausschnitt des Sequenzvergleichs der *opuBA*- (*) bzw. *opuCA*-Promotorregionen, bei denen das *gbsR* ähnliche Gen direkt angrenzt. Die Abschnitte der ermittelten OpuCR Bindemotive (grün umrandet) von Lee *et al.* (2013) sind hoch konserviert. Das Bindemotiv liegt demnach direkt auf der -35 Region des jeweiligen Promotors.

4.6 Das *opu* Regulon im marinen *B. infantis* NRRL B-14911

Auch im marin lebenden Bakterium *B. infantis* NRRL B-14911 ist ein GbsR-Typ Regulator im Genom zu finden. Angrenzend an ihn liegt ein Operon, dessen Gene vermutlich für einen OpuA-Typ Transporter kodieren, wie er aus *B. subtilis* bekannt ist. Im Folgenden soll sowohl der Transporter als auch der Regulator näher untersucht werden. Zudem wird überprüft, wofür *B. infantis* NRRL B-14911 die kompatiblen Soultte verwendet, die er vermutlich über den OpuA-Typ Transporter in die Zelle aufnehmen kann.

4.6.1 Der OpuA Transporter aus *B. infantis* NRRL B-14911

In *B. subtilis* besitzt der ABC-Transporter OpuA an sich ein großes Aufnahmespektrum für kompatible Solute (Bremer, 2001). Hierzu zählen Glycin Betain, Prolin Betain, DMSA, DMSP, DMG und HB. Besonders gut wird allerdings Glycin Betain von OpuA transportiert (Bashir *et*

al., 2014a, 2014b; Broy *et al.*, 2015; Holtmann & Bremer, 2004; Horn *et al.*, 2005; Kempf & Bremer, 1995; Smits *et al.*, 2008). Auch für den OpuA-Typ Transporter aus *B. infantis* NRRL B-14911 kann, von den bisher getesteten kompatiblen Soluten, dasselbe Aufnahmespektrum verzeichnet werden (Arnhold, 2011). Demnach transportiert OpuA aus *B. infantis* NRRL B-14911 DMSP, Glycin Betain, Homobetain und Prolin Betain. Cholin wird nicht transportiert (Arnhold, 2011).

Aus den bisherigen Ergebnissen stellt sich zum einen die Frage, warum nicht alle kompatiblen Solute, die von OpuA aus *B. infantis* NRRL B-14911 transportiert werden, auch als Induktor dienen. Zum anderen kommt die Frage auf, warum Cholin ein Induktor ist, allerdings nicht von OpuA transportiert wird. Aus diesem Grund werden die Daten von Arnhold (2011) hinsichtlich des Aufnahmespektrums von OpuA aus *B. infantis* NRRL B-14911 erneut geprüft. Zudem wird der Transporter erweitert auf sein Aufnahmespektrum getestet. Es werden im Wachstumsversuch weitere bisher nicht getestete kompatible Solute eingesetzt.

Der eingesetzte *B. subtilis*-Stamm (CAB2) besitzt das vollständige *opuA*-Operon sowie die Gene des GbsR-Typ Regulators OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911. Alle bekannten Transportsysteme für kompatible Solute (OpuABCD) mit Ausnahme von OpuE sind im verwendeten *B. subtilis*-Stamm nicht vorhanden. Als Kontrolle wird zum einen derselbe Stamm ohne den Transporter und Regulator mitgeführt und zum anderen *B. subtilis* JH642 mit allen intakten Transportern.

Im Komplementationsexperiment werden die verwendeten Stämme zunächst auf Komplexmedium ausgestrichen und inkubiert. Am nächsten Tag werden 5 ml LB Flüssigmedium mit einer Kolonie beimpft. Drei Stunden später werden 500 µl der Kultur in 20 ml SMM überführt und weitere 4 h inkubiert. Die Hauptkulturen werden aus dieser Vorkultur heraus auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft. Nach 18 stündiger Inkubation werden die End-OD₅₇₈s mit Hilfe des Photometers ermittelt.

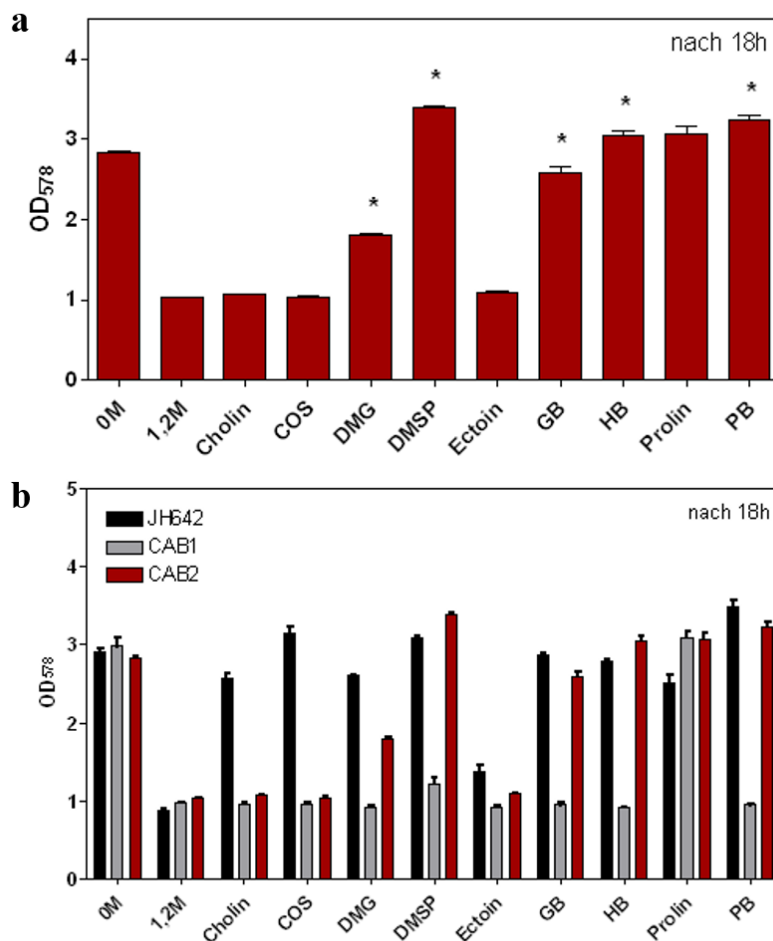


Abbildung 29: Heterologe Komplementation von OpuA aus *B. infantis* NRRL B-14911.

Dargestellt ist das Ergebnis des Komplementationsexperiments nach 18 Stunden Wachstum bei 1,2 M NaCl und 1 mM des entsprechenden kompatiblen Solut. (a) zeigt das Aufnahmespektrum des Stammes CAB2. Die mit * markierten Balken zeigen an, dass dieses compatible Solut durch OpuA aus *B. infantis* NRRL B-14911 aufgenommen werden kann. (b) zeigt dieselben Ergebnisse des Stammes CAB2, diesmal allerdings zusätzlich zum Vergleich die beiden Kontrollstämme JH642 und CAB1 (Leervektor).

Aus dem Komplementationsexperiment gehen folgenden Daten hervor: Mit OpuA aus *B. infantis* NRRL B-14911 kann der *B. subtilis*-Stamm CAB2 unter hochosmolaren Bedingungen auf eine OD₅₇₈ von ~3 nach 18 Stunden Inkubation wachsen, wenn die kompatiblen Solute DMSP, GB, HB, Prolin oder PB im Medium vorliegen (Abbildung 29). Liegen die aufgezählten kompatiblen Solute im Medium vor, werden sie über OpuA in die Zelle transportiert, sodass die Zelle sie als Osmoprotektiva nutzen kann. Folglich zeigen die Daten, dass es sich bei OpuA aus *B. infantis* NRRL B-14911 um einen Transporter mit einem Aufnahmespektrum für DMSP, GB, HB, PB und DMG (mit einer geringeren Affinität) handelt. Obwohl auch eine OD₅₇₈ von 3 mit Prolin erreicht wird, kann dieses compatible Solut nicht durch OpuA hindurch in die Zelle gelangen. Prolin wird von dem in diesem *B. subtilis*-Stamm noch vorhandenen MFS-Transporter OpuE transportiert, wie den Daten des Kontrollstamms

ohne OpuA/OpuAR (CAB1) entnommen werden kann. Unter Hochsalzbedingungen und in Abwesenheit von kompatiblen Soluten schafft der Stamm CA2 es lediglich auf eine OD₅₇₈ von ~1. Auch mit den kompatiblen Soluten Cholin, COS und Ectoin wird maximal OD₅₇₈ 1 erreicht. Folglich ist OpuA aus *B. infantis* NRRL B-14911 kein Aufnahmesystem für diese drei kompatiblen Solute.

Demzufolge, konnten die Daten von Arnhold (2011) bestätigt werden und letztlich ebenfalls klargestellt werden, dass es sich bei OpuA aus *B. infantis* NRRL B-14911 um ein OpuA-Typ Transportsystem handelt, wie es aus *B. subtilis* bekannt ist (Bashir *et al.*, 2014a, 2014b; Broy *et al.*, 2015; Holtmann & Bremer, 2004; Horn *et al.*, 2005; Kempf & Bremer, 1995; Smits *et al.*, 2008).

4.6.2 Osmotische Protektion des Bakteriums *B. infantis* NRRL B-14911

Aus dem Komplementationsversuch kann entnommen werden, dass es sich bei OpuA aus *B. infantis* NRRL B-14911 um einen Transporter mit demselben Aufnahmespektrum für kompatible Solute handelt, wie bei *B. subtilis*. Wofür *B. infantis* NRRL B-14911 die kompatiblen Solute aus seiner Umgebung aufnimmt, ist bisher nicht weiter erforscht. Es besteht zum einen die Möglichkeit, dass das Bakterium die kompatiblen Solute wie *B. subtilis* als Osmoprotektiva nutzt. Zum anderen ist es natürlich auch möglich, dass *B. infantis* NRRL B-14911 die kompatiblen Solute als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle verwertet. Um das zu überprüfen wird zunächst ein Minimalmedium für das Bakterium benötigt. Es wird als Grundmedium das Basalmedium (González *et al.*, 1997) verwendet. Aufgrund der beschriebenen Auxotrophien des Bakteriums (Alcaraz *et al.*, 2008), werden verschiedene Medienzusätze wie Casaminosäuren oder einzelne Aminosäuren beigelegt.

B. infantis NRRL B-14911 wurde zunächst auf Komplexmedium ausgestrichen und über Nacht bebrütet. Am nächsten Morgen wurden 5 ml LB Flüssigmedium mit einer Kolonie inokuliert. Am Abend desselben Tages (8 h später) werden die verschiedenen Hauptkulturkolben auf eine OD₅₇₈ von 0,1 beimpft. Nach 22 h wurden die erreichten OD₅₇₈ mit dem Photometer bestimmt.

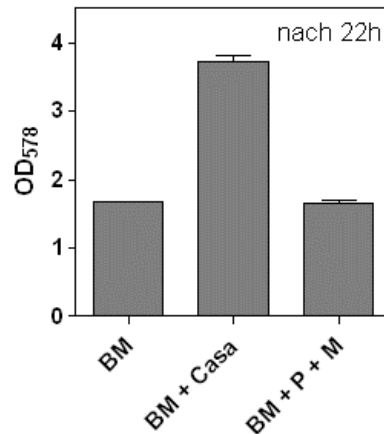


Abbildung 30: Wachstum von *B. infantis* NRRL B-4911 in Basalmedium mit verschiedenen Medienzusätzen.

Das stärkste Wachstum nach 22h ist in Basalmedium (BM) mit 0,4 % Casaminosäuren zu beobachten. (P) + (M) steht für die Zugabe der beiden Aminosäuren Prolin (20 mg/L) und Methionin (20 mg/L).

Nach 22 Stunden Wachstum in Basalmedium ohne weitere Zusätze erreicht *B. infantis* NRRL B-14911 eine OD₅₇₈ von 1,8 (Abbildung 30). Lediglich auf ungefähr dieselbe OD₅₇₈ schafft es das Bakterium trotz Zugabe von Prolin und Methionin. Die beschriebenen Auxotrophien von Prolin und Methionin scheinen nicht die Einzigen zu sein, die *B. infantis* NRRL B-14911 besitzt, da das Bakterium bei Zugabe von 0,4 % Casaminosäuren in der Lage ist, in der gleichen Zeit doppelt so hoch zu wachsen. *B. infantis* NRRL B-14911 schafft es in Basalmedium mit Casaminosäuren auf eine OD₅₇₈ von ~4. In Casaminosäuren sind u. a. freie Aminosäuren enthalten. Der Organismus kann durch den Import dieser freien Aminosäuren vermutlich weitere Auxotrophien ausgleichen.

Um auszuschließen, dass *B. infantis* NRRL B-14911 die kompatiblen Solute als C-Quelle nutzt, wurde dies in einem Wachstumsexperiment getestet. Dazu wurde eine Kolonie *B. infantis* NRRL B-14911 einer Komplexmediumplatte in 5ml LB Flüssigmedium inokuliert. Als zweite Vorkultur wurden nach 8 Stunden Inkubation 20 ml Basalmedium ohne Casaminosäuren mit Glucose auf eine OD₅₇₈ von 0,1 eingestellt. Am nächsten Morgen (nach 12 h) wurden die Hauptkulturkolben auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft. Nach 46 Stunden wurde die OD₅₇₈ der Kulturen bestimmt.

In diesem Versuch werden dem Basalmedium keine Casaminosäuren und keine Glucose beigelegt, da keine weiteren C-Quellen im Medium vorhanden sein dürfen. Das Medium der Kontrolle enthielt 27,7 mM Glucose. Um den entsprechenden Anteil an Kohlenstoffen mit Glycin Betain oder Cholin bereitzustellen, beinhaltete das Medium jeweils 33,24 mM des jeweiligen Zusatzes.

Um auszuschließen, dass in Abwesenheit von NaCl keine kompatiblen Solute, aufgrund der fehlenden Aufnahmesysteme, in den Organismus gelangen, wird der Versuch parallel bei 0,3 M NaCl durchgeführt.

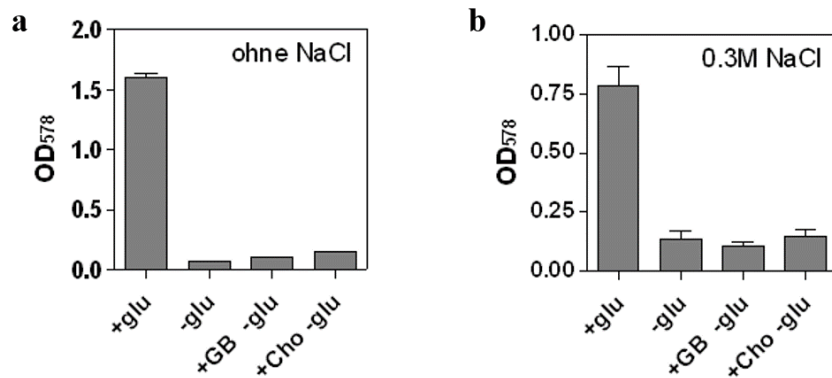


Abbildung 31: Verwertung von Cholin und Glycin Betain als Kohlenstoffquelle.

Dargestellt ist das Wachstum von *B. infantis* NRRL B-14911 in Basalmedium ohne Casaminoäuren und Glucose nach 46 h. Dem Medium wird Cholin bzw. Glycin Betain als Kohlenstoffquelle beigelegt. Alle Bedingungen werden (a) ohne und (b) mit 0,3 M NaCl getestet.

Anhand des fehlenden Wachstums, ohne Glucose und trotz Zugabe von Cholin bzw. Glycin Betain, kann geschlossen werden, dass *B. infantis* NRRL B-14911 diese beiden kompatiblen Solute nicht als Kohlenstoffquelle nutzt (Abbildung 31). In Anwesenheit von Glucose sowohl ohne als auch mit Salz, ist das Bakterium eindeutig in der Lage zu wachsen (OD_{578} von 1,6 bzw. 0,75), da die essentiellen Kohlenstoffe durch Glucose bereitgestellt werden. Liegt keine Glucose im Medium vor ist weder ohne Salz noch mit Salz Wachstum zu beobachten. *B. infantis* NRRL B-14911 kann aufgrund der fehlenden Kohlenstoffquelle nicht wachsen.

Da *B. infantis* NRRL B-14911 die kompatiblen Solute nicht aufnimmt, um sie als Kohlenstoffquelle zu verwerten, wird angenommen, dass sie als Osmoprotektiva dienen. Um dies experimentell zu belegen, muss zunächst herausgefunden werden, bei wie viel Molar NaCl die Salztoleranzgrenze von *B. infantis* NRRL B-14911 erreicht ist. Dazu wurde ein Wachstumsexperiment mit steigenden NaCl-Konzentrationen durchgeführt. Hierzu wurde *B. infantis* NRRL B-14911 auf Komplexmedium ausgestrichen. Nach 16 Stunden Inkubation wurde eine Kolonie in 5 ml LB überführt. Am Abend (8 h später) wurde 20 ml Basalmedium (mit 0,4 % Casaminoäuren) auf eine OD_{578} von 0,1 beimpft. Nach weiteren 16 h wurden die

Hauptkulturen mit den verschiedenen Salzkonzentrationen inokuliert. Die OD_{578} wurde das erste Mal nach 25 Stunden und zwei weitere Male nach 30 und nach 35 Stunden bestimmt.

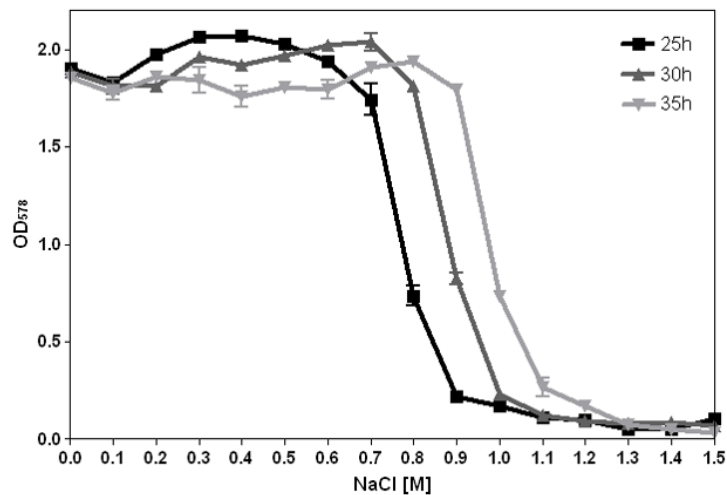


Abbildung 32: Wachstumsanalyse von *B. infantis* NRRL B-14911 bei steigender Osmolarität.

Der Graph zeigt das Wachstumsverhalten bei verschiedenen Salzkonzentrationen im Medium nach 25, 30 und 35 Stunden. Die Salztoleranzgrenze liegt für das Bakterium bei 0,9 M NaCl nach 25 Stunden Inkubation.

Im Wachstumsexperiment ist zu sehen, dass *B. infantis* NRRL B-14911 in der Lage ist nach 25 Stunden bis zu einer Salzkonzentration von 0,9 M NaCl im Medium zu wachsen (Abbildung 32). Die Toleranzgrenze liegt also bei 0,8 M, wie einst ebenfalls von Siefert *et al.* (2000) beobachtet wurde. Nach fünf weiteren Stunden Inkubation schafft das Bakterium es auch bis zu einer Konzentration von 1 M NaCl.

Um zu testen, ob *B. infantis* NRRL B-14911 einen Wachstumsvorteil unter hochosmolaren Bedingungen durch die Zugabe verschiedener kompatibler Solute hat, wird das Bakterium im nächsten Experiment bei einer Salzkonzentration von 0,9 M NaCl inkubiert. Zudem werden jeweils verschiedene kompatible Solute ins Medium gegeben. Eine Kolonie des Bakteriums *B. infantis* NRRL B-14911 wurde von einer Platte in 5 ml LB Flüssigmedium überführt. Nach 8 Stunden Inkubation wurde mit dieser Kultur eine weitere Vorkultur (20 ml Basalmedium + 0,4 % Casaminoäuren) auf eine OD_{578} von 0,1 eingestellt. Nach weiteren 16 h wurden die Hauptkulturen 0,9M NaCl und den verschiedenen kompatiblen Soluten auf eine OD_{578} von 0,1 inokuliert. Eine Bestimmung der OD_{578} aller Proben erfolgte nach weiteren 29 Stunden Inkubation.

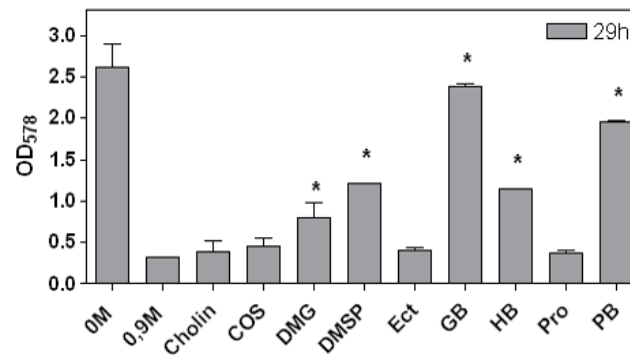


Abbildung 33: Osmoprotektion von *B. infantis* NRRL B-14911 und verschiedenen kompatiblen Soluten.






Gezeigt ist das Wachstum von *B. infantis* NRRL B-14911 nach 29 Stunden bei einer Salzkonzentration von 0,9 M NaCl. Mit den kompatiblen Soluten DMG, DMSP, Glycin Betain, HB und PB zeigt das Bakterium einen Wachstumsvorteil. Es kann sie als Osmoprotektiva nutzen.

Da *B. infantis* NRRL B-14911 die kompatiblen Solute nicht als C-Quelle nutzt, liegt es nahe, dass der Organismus sie zum Schutz unter Hochsalzbedingungen aufnimmt. Dies kann im durchgeführten Experiment bestätigt werden (Abbildung 33). Während ohne kompatible Solute nur ein sehr geringes Wachstum zu verzeichnen ist, zeigt *B. infantis* NRRL B-14911 ein deutlich verbessertes Wachstum mit den kompatiblen Soluten DMG, DMSP, Glycin Betain, HB und Prolin Betain. Besonders deutlich wird das mit den beiden kompatiblen Soluten Glycin Betain und Prolin Betain, bei denen *B. infantis* NRRL B-14911 fast in der Lage ist, nach 29 Stunden auf dieselbe OD₅₇₈ zu wachsen wie das Bakterium ohne Salz. Beide kompatiblen Solute scheint *B. infantis* NRRL B-14911 besonders gut als Osmoprotektiva nutzen zu können. Mit den kompatiblen Soluten Cholin, COS, Ecton und Prolin zeigt das Bakterium hingegen keinen Wachstumsvorteil.

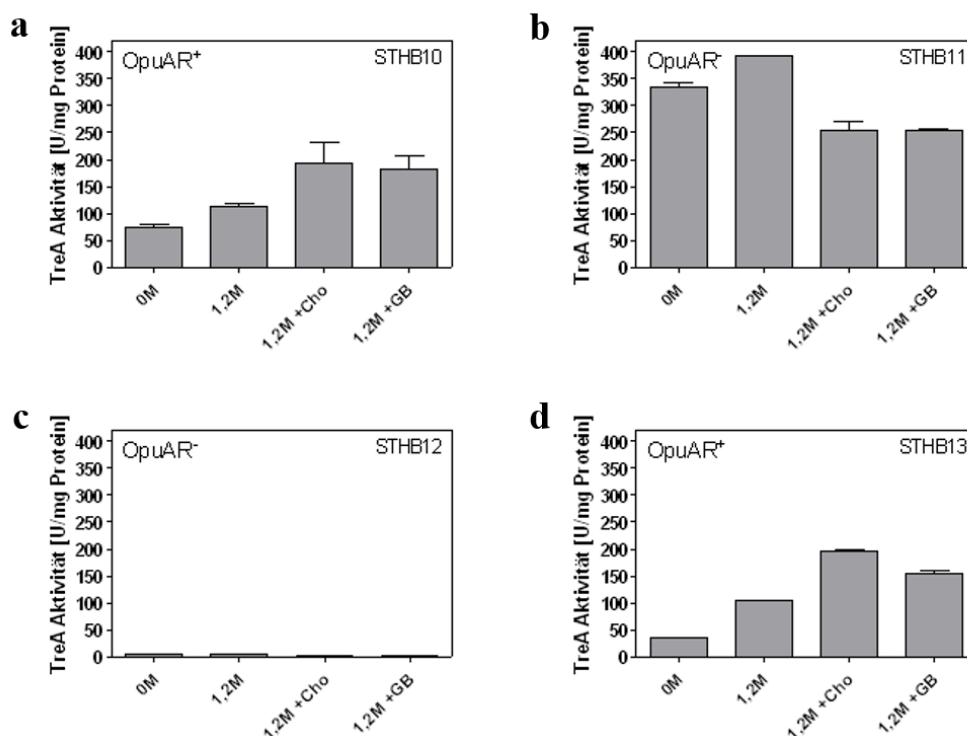
4.6.3 Der DNA bindende Regulator OpuAR aus dem marinen *B. infantis* NRRL B-14911

Durch die direkte Bindung der DNA im Promotorbereich reguliert sowohl GbsR als auch OpuCR aus *B. subtilis* die Genexpression des genomisch angrenzenden Operons. Es soll nun geklärt werden, ob auch OpuAR durch die Bindung an die DNA im intergenen Bereich der beiden Gene *opuAR* und *opuAA* in *B. infantis* NRRL B-14911 die Expression des angrenzenden putativen *opuA*-Operons reguliert. Es wurden dafür zunächst einige Reportergenfusionen von *opuAA* aus *B. infantis* NRRL B-14911 erzeugt. Die genauen Regionen, die vor das promotorlose Reportergen kloniert wurden, können Tabelle 12 entnommen werden.

Tabelle 12: Übersicht aller erzeugten *opuAA*-Fusionsstämme

Stammname		Beschreibung
STHB10		1940 bp Insert
STHB11		1375 bp Insert
STHB12		109 bp Insert
STHB13		871 bp Insert

Um mögliche Verfälschungen der Ergebnisse, durch eine Interaktionen der drei GbsR-typ Regulatoren aus *B. subtilis* mit der zu testenden Region zu vermeiden, wurden die Fusionen in einem *B. subtilis*-Stamm ohne *gbsR*-, *opuBR*- und *opuCR*-Gen vermessen. Die Messungen erfolgten wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben. Da bereits bekannt ist, dass OpuAR Cholin bindet (Henkel, 2010), wird ebenfalls der Einfluss von Cholin auf die Regulation getestet. Auch Glycin Betain wird als möglicher Induktor eingesetzt, da es sich bei OpuA u.a. um einen Glycin Betain Transporter handelt (Arnhold, 2011; 4.6.1).

**Abbildung 34: Regulation des *opuA*-Operons durch OpuAR in *B. infantis* NRRL B-14911.**

Zu sehen sind die Ergebnisse der TreA Messungen der verschiedenen *opuAA*-*treA*-Fusionen. (a) zeigt die Messdaten des Stammes STHB10, (b) von STHB11, (c) von STHB12 und (d) die des Stammes STHB13.

Anhand der TreA Messungen kann abgeleitet werden, dass OpuAR tatsächlich für die Regulation der Expression des *opuA*-Operons zuständig ist. Sowohl mit als auch ohne Salz hemmt OpuAR die Expression des *opuAA*'-*treA*-Reportergens (Abbildung 34, (a) & (d)). Ist kein OpuAR in der Zelle vorhanden, steigt die Expression um das Vierfache an (Abbildung 34 (b)).

Den Daten in Abbildung 34 (a) & (d) kann zudem entnommen werden, dass sowohl Cholin als auch Glycin Betain im System als Induktoren dienen. Während in Anwesenheit von Salz ~100 U/mg Protein gemessen werden konnten, steigen die Werte auf das Doppelte an, wenn zusätzlich Cholin oder Glycin Betain ins Medium gegeben wird. Liegt also eines der beiden Moleküle in der Zelle vor, wird es vermutlich vom Regulator gebunden. OpuAR löst sich von der DNA und die Gene des *opuA*-Operon können transkribiert werden.

Neben den regulatorischen Informationen durch OpuAR zeigen die Daten, dass das *opuA*-Operon aus *B. infantis* NRRL B-14911 nicht Salz-induziert ist (Abbildung 34, (b)). Sowohl ohne Salz als auch mit Salz sind die Expressionswerte in Abwesenheit des Repressors nahezu gleich hoch (zwischen 300 und 400 U/mg Protein).

Im Fall des Stammes STHB12 scheinen essentielle Promotorbestandteile zu fehlen, da keinerlei TreA-Aktivität gemessen werden konnte. Dies bedeutet, dass mindestens ein Teil des Promotors weiter als 109 bp entfernt vom *opuAA* liegen muss.

In Abwesenheit von OpuAR (Abbildung 34, (b)) ist deutlich zu erkennen, dass die Expression der *opuAA*'-*treA*-Reportergenfusion mit Cholin oder Glycin Betain weniger stark ist als die beiden Werte ohne kompatible Solute. Möglicherweise haben Cholin und Glycin Betain einen Einfluss auf die Expression des *opuA*-Operons. Dies ist ebenfalls der Fall für Glycin Betain beim *opuA*-Operon aus *B. subtilis*. Hier konnte beobachtet werden, dass eine steigende Konzentration von intrazellulärem Glycin Betain eine fallende *opuA*-Expression zur Folge hat (Hoffmann *et al.*, 2013).

Da OpuAR tatsächlich die Expression des *opuA*-Operons aus *B. infantis* NRRL B-14911 durch die Bindung an die DNA reguliert, soll nun das genaue Bindemotiv von OpuAR in der intergenen Region von *opuAR* und *opuAA* bestimmt werden. Dies wird zunächst *in silico* via Sequenzvergleich gemacht. Dafür werden die intergenen Regionen aller GbsR-Typ Regulatoren und deren angrenzenden Transporter der OpuA-Untergruppe miteinander verglichen.

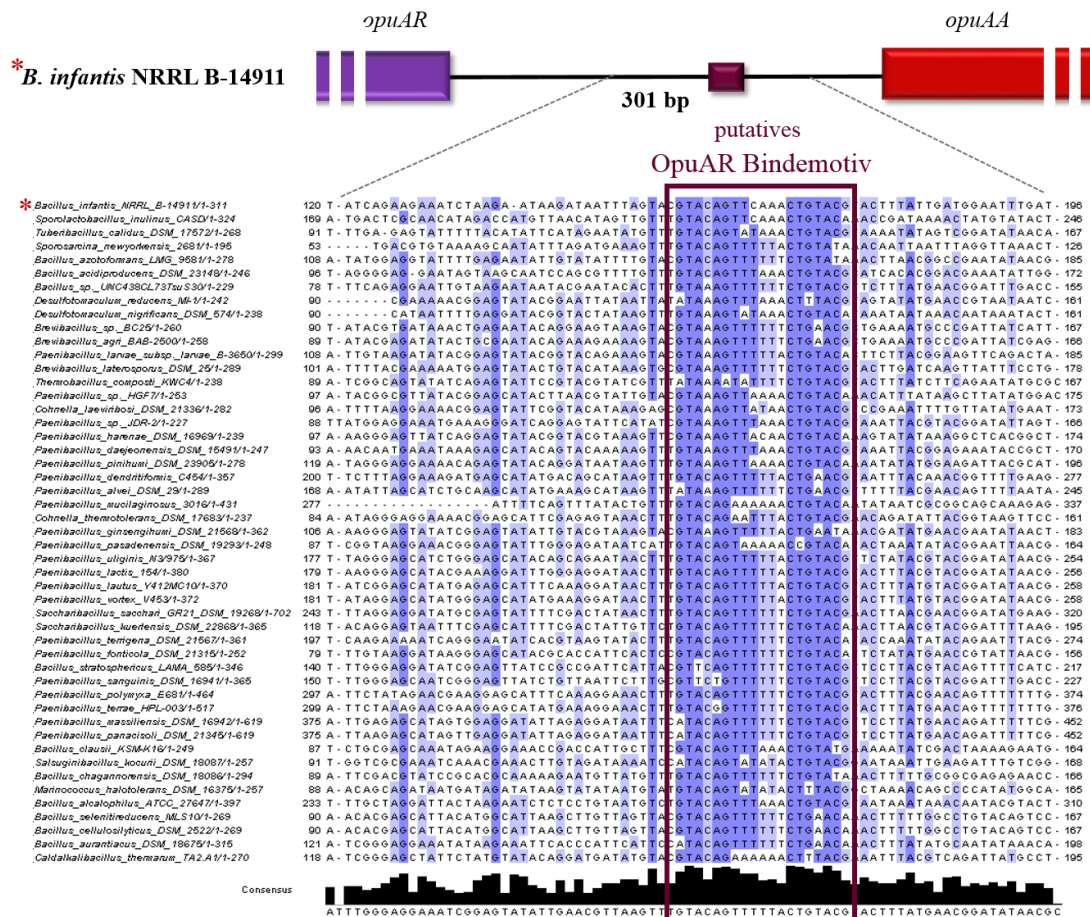


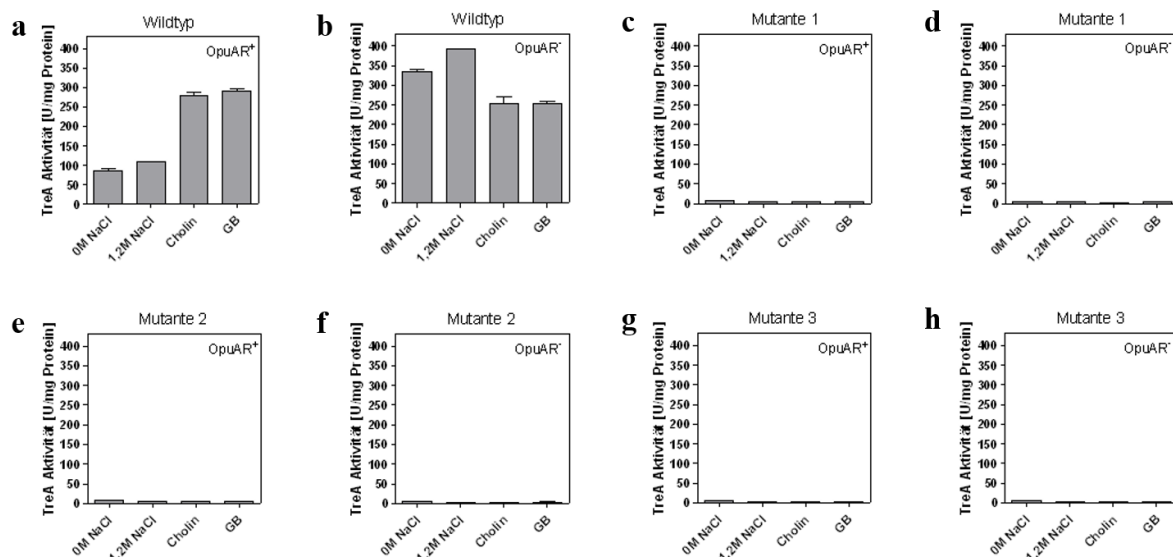
Abbildung 35: Sequenzvergleich der Promotorregion aller opuAA Gene der OpuA-Untergruppe. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Vergleichs der Promotorregion aller opuAA-Gene der OpuA-Untergruppe. Im konservierten Bereich ist die palindromische Region -GTACAG-N-CTGTAC- zu finden, die das OpuAR Bindemotiv darstellen könnte.

Im Sequenzvergleich der gesamten opuAA-Promotorregionen sticht deutlich der mittlere Bereich aufgrund seiner Konservierung hervor (Abbildung 60; Anhang). Im am stärksten konservierten Abschnitt dieser Region, kann die palindromische Region -GTACAG-N-CTGTAC- gefunden werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Palindrom um das OpuAR Bindemotiv handelt. Aus diesem Grund, wird versucht, das bioinformatisch ermittelte OpuAR Bindemotiv mit einigen opuAA'-treA-Fusionen zu bestätigen. Die verwendeten opuAA'-treA-Fusionen enthalten verschiedene Deletionen im bioinformatisch vorhergesagten OpuAR Bindemotiv. Die genauen deletierten Bereiche der einzelnen Mutanten können Tabelle 13 entnommen werden.

Tabelle 13: Übersicht aller *opuAA*-Promotorregion Mutationen

Deletion	<i>gbsA</i>	<i>opuAR</i>	Stamm-name	Beschreibung
TAAGATAATTAGTACGTACAGTTCAAACGTACGTACTTTA-/ 115 bp /-TTTAGAGGTGGATTTATGGCT		+	STHB10	Wildtyp
		-	STHB11	
TAAGATAATTAGTAC Δ GTACTTTA-/ 115 bp /-TTTAGAGGTGGATTTATGGCT		+	STHB68	Mutation 1
		-	STHB71	
TAAGATAATTAGTAC Δ TTCAAACGTACGTACTTTA-/ 115 bp /-TTTAGAGGTGGATTTATGGCT		+	STHB69	Mutation 2
		-	STHB72	
TAAGATAATTAGTACGTACAGTTCAA Δ GTACTTTA-/ 115 bp /-TTTAGAGGTGGATTTATGGCT		+	STHB70	Mutation 3
		-	STHB73	

Auch hier wurde bei der Stammkonstruktion ein *B. subtilis*-Stamm ohne die *gbsR*-, *opuBR*- und *opuCR*-Gene verwendet, um keine regulatorischen Nebeneffekte zu detektieren. Ansonsten wurde der Versuch identisch zum Vorherigen durchgeführt (3.5.2).

**Abbildung 36: Ergebnisse der OpuAR Bindemutation *opuAA'*-*treA*-Fusionsmutanten.**

Zu sehen sind alle Ergebnisse der TreA Messungen aller *opuAA'*-*treA*-Fusionen mit Deletionen im bioinformatisch bestimmten OpuAR Bindemotiv. Das Bindemotiv scheint auf wichtigen Elementen des *opuAA*-Promotors zu liegen, da keine Aktivität mehr gemessen werden konnte.

Wie den Daten entnommen werden kann, ist bei keiner der OpuAR Bindemotiv Deletionsmutanten eine TreA-Aktivität, die auf eine Expression des *opuAA* hindeuten könnte, zu sehen. Auszuschließen ist, dass die Fusionen einen generellen Defekt aufweisen, da sie ein Basallevel von 3-6 U/mg Protein aufweisen. Folglich scheint bei den Deletionsmutanten neben dem vorhergesagten OpuAR Bindemotiv eine oder mehrere wichtige Komponenten des Promotors entfernt worden zu sein. Es wird im Folgenden nach einer möglichen -35 Region

4.6.4 Spezifität des OpuAR Bindemotivs aus *B. infantis* NRRL B-14911

Aus *B. subtilis* ist bekannt, dass sowohl der Repressor GbsR als auch der GbsR-Typ Regulator OpuCR, für die Regulation eines nicht genomisch angrenzenden Operons zuständig ist. Beide Regulatoren reprimieren die Expression des *opuB*-Operons, dass für den Cholin-sensitiven Repressor kodiert (Lee *et al.*, 2013; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Es stellt sich daher die Frage, ob auch einer der beiden Regulatoren möglicherweise Einfluss auf die Expression des *opuA*-Operons aus *B. infantis* NRRL B-14911 nehmen kann. Da auch der dritte GbsR-Typ Regulator OpuBR aus *B. subtilis* zur Transporter-Klasse zählt, ist auch dessen Einwirkung durch das Binden der *opuAA*-Promotorregion aus *B. infantis* NRRL B-14911 denkbar.

Mit einer *opuAA*'-treA-Reportergenfusion aus *B. infantis* NRRL B-14911, die ins Genom der entsprechenden *B. subtilis*-Stämme integriert wurde, soll dies überprüft werden. Im zu testenden Stamm ist jeweils nur einer der drei GbsR-Typ Regulatoren aus *B. subtilis* vorhanden. Zudem ist kein OpuAR anwesend. Die Zellen wurden ohne Salz herangezogen und bei einer OD₅₇₈ von 1,5 geerntet, wie es in Kapitel 3.5.2 beschrieben ist. Die TreA-Messungen wurden ebenfalls wie dort geschildert, durchgeführt.

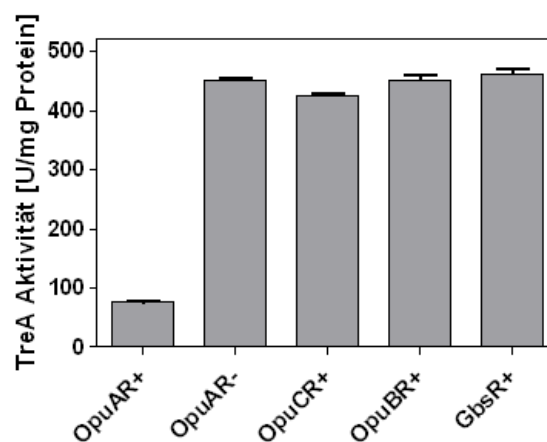


Abbildung 38: Einfluss der GbsR-Typ Regulatoren aus *B. subtilis* auf die *opuAA*-Expression des *B. infantis* NRRL B-14911.

Dargestellt sind die Ergebnisse der *opuAA*'-treA-Reportergenfusion in Anwesenheit von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911, OpuBR, OpuCR & GbsR aus *B. subtilis*. Keiner der drei GbsR-Typ Regulatoren aus *B. subtilis* reguliert die Expression des *opuA*-Operons aus *B. infantis* NRRL B-14911.

In Anwesenheit von GbsR, OpuBR oder OpuCR aus *B. subtilis* ist die Expression von *opuAA* nicht reprimiert (Abbildung 38). In Gegenwart des jeweiligen GbsR-Typ Regulators ist die TreA-Aktivität genauso hoch, wie die der Kontrolle ohne OpuAR. Eine deutliche Repression ist, wie erwartet, bei der Positivkontrolle in Anwesenheit des OpuAR zu sehen, dessen negative Regulation auf das *opuA*-Operon bereits mehrfach in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Folglich ist keiner der drei GbsR-Typ Regulatoren aus *B. subtilis* in der Lage die Expression des *opuA*-Operons aus *B. infantis* NRRL zu regulieren. Das OpuAR Bindemotiv vor *opuAA* im marinen *B. infantis* NRRL B-14911 ist demnach sehr spezifiv.

4.6.5 Induktoren des OpuAR Regulators aus *B. infantis* NRRL B-14911

Wie gezeigt werden konnte, reguliert der GbsR-Typ Regulator OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 die Gene des OpuA-Typ Transporters. Der OpuA Transporter aus *B. infantis* NRRL B-14911 ist in der Lage das kompatible Solut Glycin Betain zu transportieren (Arnhold, 2011; 4.6.1). Wie bereits in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, spielt Glycin Betain als Induktor in der Regulation der Genexpression des dafür kodierenden *opuA*-Operons eine wichtige Rolle. Es soll nun geklärt werden, ob Glycin Betain direkt von OpuAR gebunden werden kann. Dies wird, wie es bereits für den anderen bekannten Induktor Cholin gemacht wurde (Henkel, 2010; Ziegler, 2009), in fluoreszenzspektroskopischen Messungen überprüft. Die Messungen erfolgten wie in Kapitel 3.5.10 beschrieben. Für die Messungen wurde das Protein OpuAR zunächst überproduziert (3.5.3), gereinigt und umgepuffert (3.5.6) in 25 mM Tris/ 25mM NaCl pH 7,5.

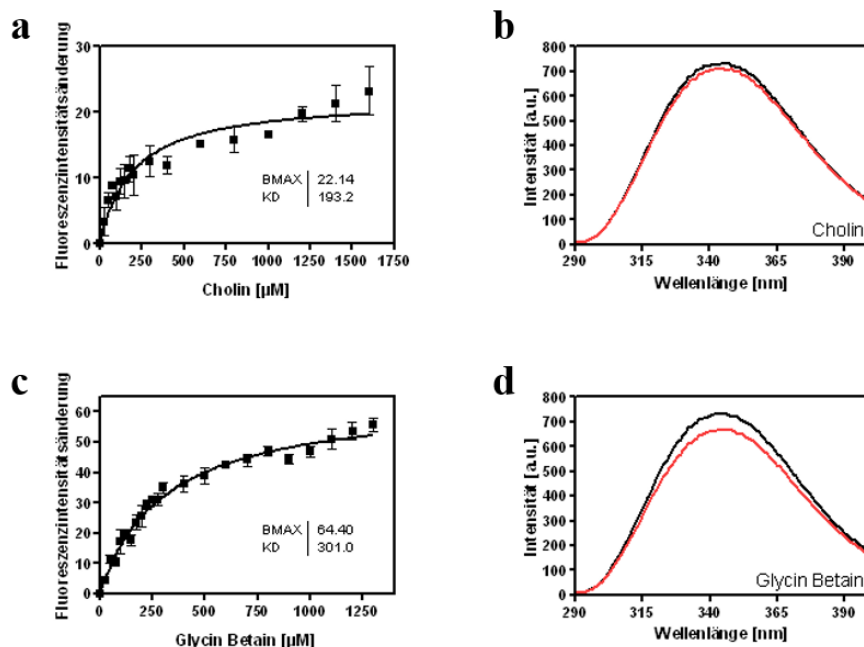


Abbildung 39: Fluoreszenzspektroskopische Messungen mit OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 und den beiden kompatiblen Soluten Cholin und Glycin Betain.

Sowohl für Cholin (a) als auch für Glycin Betain (c) konnte eine K_D erstellt werden. Für Cholin liegt die K_D bei $193 \pm 40 \mu\text{M}$ und für Glycin Betain bei $301 \pm 25 \mu\text{M}$. Die Intensitätsänderung von Cholin (b) und Glycin Betain (d) sind über eine Wellenlänge von 290 nm bis 400 nm dargestellt. Jeweils ohne (schwarz) und nach Zugabe von 1,6 mM bzw. 1,3 mM komaptibles Solut (rot).

Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass Cholin mit einer K_D von $232 \mu\text{M} \pm 25 \mu\text{M}$ von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 gebunden wird (Henkel, 2010). Mit einer K_D von $193 \mu\text{M} \pm 40 \mu\text{M}$ konnten diese Daten nun erfolgreich reproduziert werden (Abbildung 39).

Auch die Bindung von Glycin Betain an OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 ist anhand der fluoreszenzspektroskopischen Messungen bewiesen. Glycin Betain wird mit einer Affinität von $K_D 301 \mu\text{M} \pm 25 \mu\text{M}$ etwas schlechter gebunden (Abbildung 39).

Da OpuA aus *B. subtilis* neben Glycin Betain einige weitere kompatible Solute mit geringerer Affinität transportiert (Bremer, 2001), kann sich vorgestellt werden, dass noch weitere kompatible Solute als Induktor von OpuAR aus *B. infantis* NRRL N-14911 in Frage kommen. Spezifisch wird dabei davon ausgegangen, dass die kompatiblen Solute eine Rolle spielen, die wie Glycin Betain durch OpuA in die Zelle gelangen. Auch mit diesen kompatiblen Soluten werden fluoreszenzspektroskopische Messungen durchgeführt. Um zunächst zu überprüfen, welche weiteren kompatiblen Solute von OpuAR gebunden werden, wird von jedem zu testenden kompatiblen Solut $1,6 \text{ mM}$ in die Küvette gegeben.

Bei der Bindung eines Liganden nimmt das Protein eine Konformationsänderung vor. Diese Konformationsänderung wird im Fluoreszenzspektroskop durch die Veränderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz des Proteins detektiert. Bindet OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 wie im Fall von Cholin-O-Sulfat (COS), DMG, DMSP, Ectoin, Homobetain und Prolin nicht den Liganden, wird keine Intensitätsänderung detektiert (Abbildung 40). Über einen Wellenlängenbereich von 290 nm bis 400 nm ist nach Zugabe von $1,6 \text{ mM}$ Prolin Betain eine Intensitätsänderung zu sehen. Folglich bindet OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 neben Cholin und Glycin Betain auch das kompatible Solut Prolin Betain. Es soll nun ermittelt werden, wie stark die Bindung von OpuAR zum Liganden Prolin Betain ist. Hierfür wird auch für Prolin Betain eine K_D erstellt.

Aus der Michaelis Menten Kurve, bei der die Fluoreszenzintensitätsänderung bei einer Wellenlänge von 345 nm gegen die Prolin Betain Konzentration aufgetragen wird, wird die Bindungsaffinität (K_D) des Proteins zu seinem Liganden ermittelt (Abbildung 41). Für OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 liegt die so ermittelte Affinität zu seinem Liganden Prolin Betain bei einer K_D von $217 \mu\text{M} \pm 37 \mu\text{M}$. Somit wird Prolin Betain etwa gleich stark von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 gebunden, wie sein Ligand Cholin.

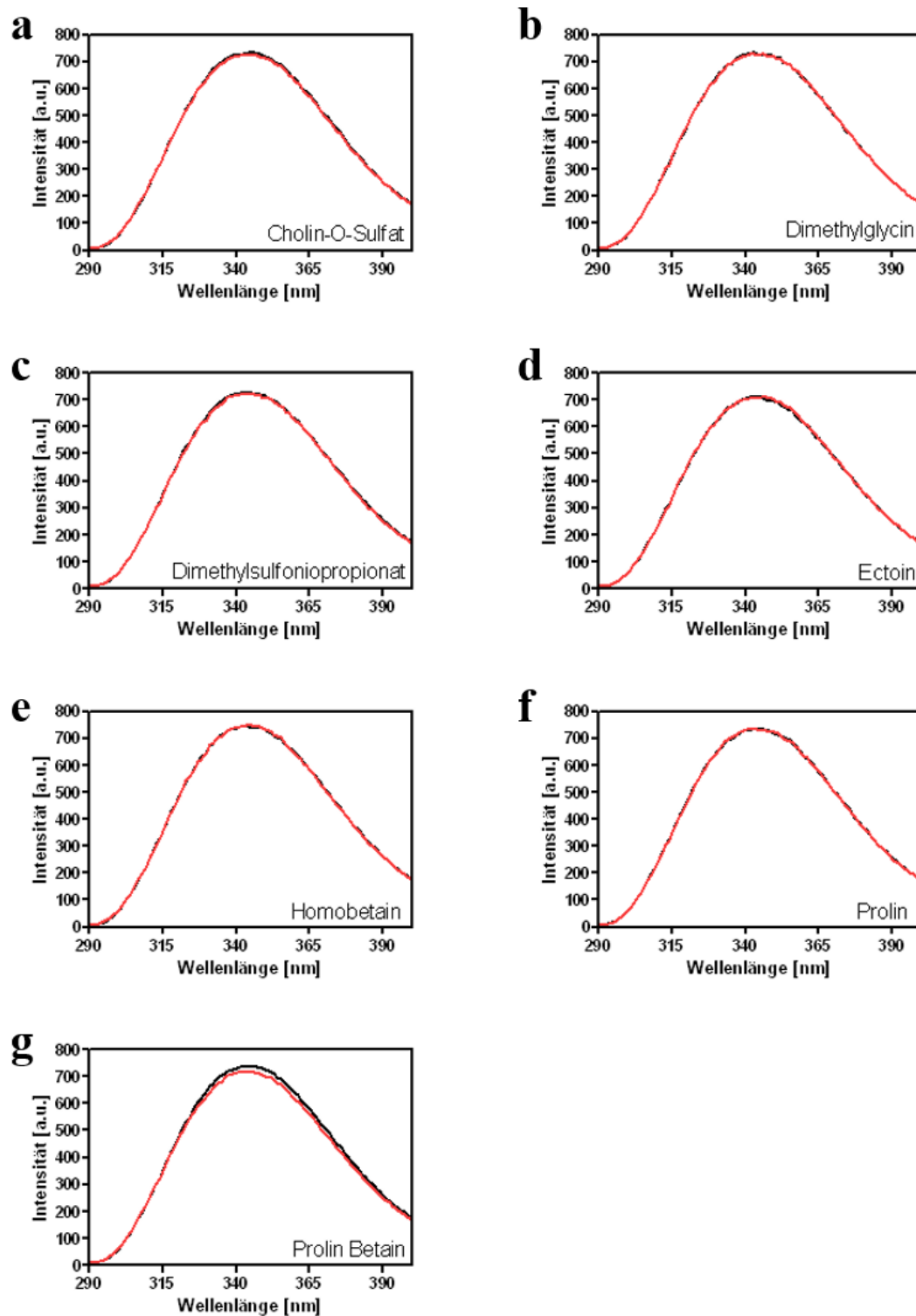


Abbildung 40: Fluoreszenzintensitätsänderung der Messungen mit OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 und verschiedener kompatibler Solute.

Es wurde jeweils die Fluoreszenzintensität über den Wellenlängenbereich von 290 nm bis 400 nm gemessen. Jeder Probe wurde ohne kompatibles Solut (schwarz) und mit 1,6 mM kompatibles Solut (rot) vermessen. Nur mit (h) Prolin Betain ist eine Änderung zu sehen. Es ist keine Änderung für (a) Cholin-O-Sulfat, (b) DMG, (c) DMSG, (d) Ection, (e) Homobetain (f) Prolin und (g) Prolin Betain zu sehen.

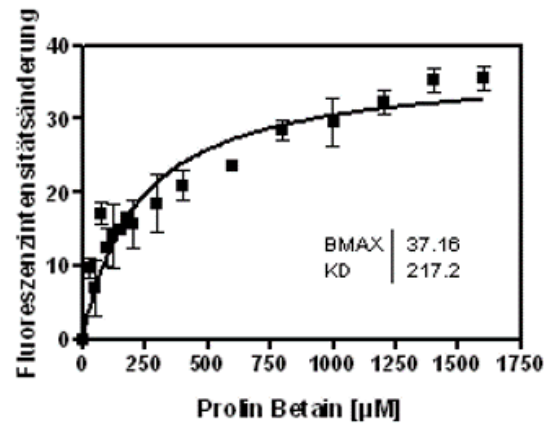


Abbildung 41: Bindungsaffinität von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 zu Prolin Betain. Prolin Betain wird mit einer K_D von $217 \mu\text{M} \pm 37 \mu\text{M}$ gebunden.

Da die Bindung von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 zum Liganden Prolin Betain nachgewiesen werden konnte, soll nun überprüft werden, ob Prolin Betain als Induktor bei der transkriptionellen Regulation fungiert. Hierzu wurde der vorhandene *opuAA'-treA*-Fusionsstamm STHB10 (*B. subtilis*-Stamm) in Anwesenheit von OpuAR und unter hochosmolaren Bedingungen erneut vermessen (3.5.2). Diesmal wird statt Cholin oder Glycin Betain, Prolin Betain als Induktor des Systems geprüft. Außerdem werden alle anderen kompatiblen Solute im Versuch eingesetzt, um die vorangegangenen Ergebnisse mit dem Fluoreszenzspektroskop zu bestätigen.

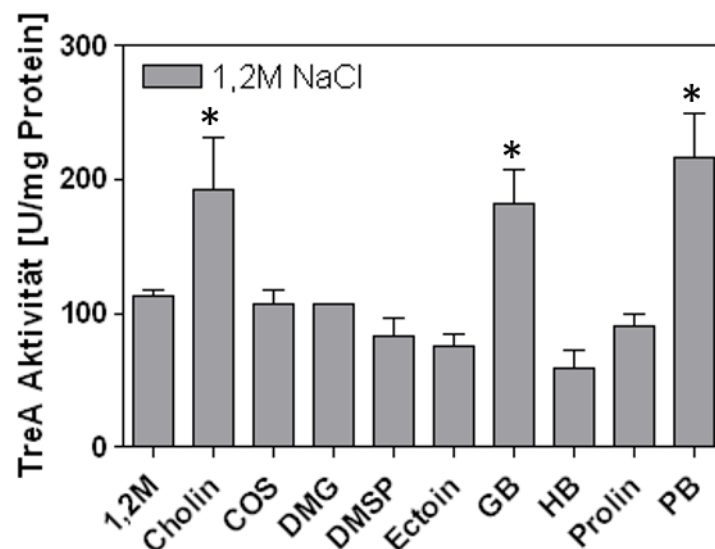


Abbildung 42: Induktoren der *opuAA* Expression von *B. infantis* NRRL B-14911.

Gezeigt sind die Ergebnisse des TreA-Experiments mit dem *B. subtilis*-Stamm STHB10 unter hochosmolaren Bedingungen und den verschiedenen kompatiblen Soluten. Die * kennzeichnen die kompatiblen Solute, die einen Einfluss auf OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 haben.

Wie anhand der Ergebnisse der Fluoreszenzspektroskopischen Messungen zu erwarten war, ist der einzige weitere Induktor neben Cholin und GB, Prolin Betain (Abbildung 42). Wie bereits zuvor bei Cholin und Glycin Betain beobachtet, ist die Expression von *opuAA* bei 1,2 M NaCl und Prolin Betain im Medium doppelt so stark (~200 U/mg Protein), wie ohne kompatibles Solut. Demzufolge löst sich OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 durch die Bindung von Prolin Betain von der DNA. OpuAR fungiert in diesem Moment nicht mehr als Repressor der Transkription. Bei den sechs weiteren getesteten kompatiblen Soluten COS, DMG, DMSP, Ectoin, HB und Prolin ist keine erhöhte TreA-Aktivität im Vergleich zur Probe ohne kompatible Solute zu sehen. Es ist durchschnittlich eine TreA-Aktivität von ~100 U/mg Protein gemessen worden. Demzufolge handelt es sich bei diesen kompatiblen Soluten nicht um Induktoren. Auch dieses Ergebnis war anhand der vorausgegangenen Bindungsstudien zu erwarten.

4.7 Die Liganden Bindetasche der GbsR-Typ Regulatoren

4.7.1 Die Aromatische Ligandenbindetasche

GbsR aus *B. subtilis* reprimiert durch das Binden an die DNA die Expression des *opuB*-Operons und die des *gbsAB*-Operons. Durch die Bindung des Liganden Cholin kommt es zu einer Konformationsänderung des Regulators, sodass es nicht mehr an die DNA binden kann. Mit Hilfe des Kristallstrukturmodells von GbsR lässt sich ein möglicher Bereich zuordnen, der an der Bindung von Cholin beteiligt sein könnte. Genau in dieser Region liegen vier Phenylalanine (F⁹⁶, F⁹⁹, F¹⁰² und F¹⁰³), die eine Ligandenbindetasche für Cholin bilden könnten. Dass zumindest zwei dieser Phenylalanine an der Bindung zu Cholin beteiligt sind, konnte von Henkel (2010) an dem homologen Protein OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-19411 zeigen. Zwischen der aromatischen Aminosäuren und dem Liganden kommt es in diesem Fall zu einer Kation- π Interaktion. Im Nachhinein wurden noch zwei weitere Phenylalanine in direkter Nähe der anderen vier Aromaten entdeckt. Es soll überprüft werden, ob auch sie an der Bindung von Cholin in GbsR aus *B. subtilis* beteiligt sind. Wie zuvor wird dafür die Bindetasche des GbsR-Homologs OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 mutiert. An den entsprechenden Positionen, der in GbsR neu entdeckten Phenylalanine, befinden sich in OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 ein Trypophan (W⁹³) und ein Asparagin (N⁹⁶). Beide Aminosäuren sollen analog zur Bindetasche in GbsR aus *B. subtilis* zu Phenylalaninen ausgetauscht werden. In fluoreszenzspektroskopischen Messungen wird dann die Bindeaffinität der OpuAR-Mutanten zu Cholin bestimmt. Zunächst werden sowohl das OpuAR-Wildtyp Protein als auch alle

insgesamt fünf Mutanten überproduziert (3.5.3; Abbildung 67; Anhang), gereinigt und umgepuffert (3.5.6) in 25 mM Tris/ 25mM NaCl pH 7,5 (Abbildung 43).

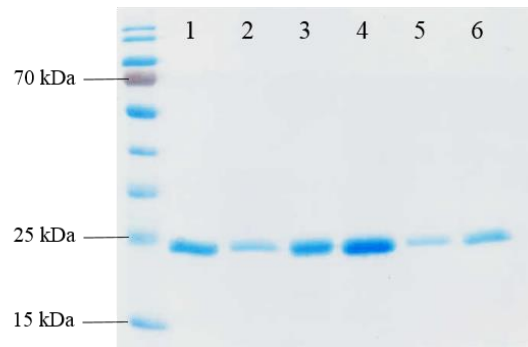


Abbildung 43: Reinigung aller OpuAR-Bindeboxmutanten.

Dargestellt ist ein SDS-Gel mit den gereinigten Proteinen (1) OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911, (2) OpuAR Y⁹⁴F, (3) OpuAR R¹⁰⁰F, (4) OpuAR Y⁹⁴F R¹⁰⁰F, (5) OpuAR W⁹³F und (6) OpuAR N⁹⁶F. Die Proteine sind 22,7 kDa groß.

Nach der erfolgreichen Reinigung der Proteine wurde begonnen, die Daten des Wildtyp-Proteins und die der Mutanten OpuAR Y⁹⁴F, OpuAR R¹⁰⁰F und OpuAR Y⁹⁴F R¹⁰⁰F am Fluoreszenzspektroskop zu untersuchen. Hierbei wurde für alle vier Proteine die Bindeaffinität zu Cholin bestimmt (3.5.10). Die einzelnen Sättigungskurven und Intensitätsänderungen sind dazu im Anhang (Abbildungen 69 & 70; Anhang) zu finden.

Tabelle 14: Übersicht der Bindeaffinitäten von OpuAR-Wildtyp und aller OpuAR-Mutanten zu Cholin & Glycin Betain

AS in OpuAR	93	94	96	97	100	101	Cholin [μM] (Henkel, 2010)	Cholin [μM] diese Arbeit	GB [μM] diese Arbeit
GbsR	F	F	F	F	F	F	165+/-15	-	-
OpuAR	W	Y	N	F	R	F	232+/-25	193+/-40	301+/-24
W ⁹³ F	F	Y	N	F	R	F	-	210+/-33	224+/-24
N ⁹⁶ F	W	Y	F	F	R	F	-	262+/-34	254+/-39
Y ⁹⁴ F	W	F	N	F	R	F	211+/-15	240+/-33	293+/-37
R ¹⁰⁰ F	W	Y	N	F	F	F	77+/-1	100+/-15	303+/-40
Y ⁹⁴ F R ¹⁰⁰ F	W	F	N	F	F	F	35+/-6	61+/-11	70+/-12

Aus den Daten geht hervor, dass sowohl die Bindeaffinität zu Cholin des OpuAR-Wildtyps als auch die der OpuAR-Mutanten von Henkel (2010) reproduziert werden konnten (Tabelle 14). Für das OpuAR-Wildtyp konnte eine K_D von $193 \mu\text{M} \pm 40 \mu\text{M}$ zu Cholin gemessen werden. Dies entspricht dem bereits bekannten Wert aus der Bachelorarbeit von Henkel (2010).

Tendenziell sind die K_D s der Mutanten in etwa $30 \mu\text{M}$ schlechter als in Henkel (2010) gezeigt. Beispielsweise wurde für OpuAR Y⁹⁴F ursprünglich eine K_D von $211 \mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$ zu Cholin ermittelt (Henkel, 2010). Nun liegt die Bindeaffinität zu Cholin für diese Mutante bei $240 \mu\text{M} \pm 33 \mu\text{M}$. Bezieht man die Standardabweichungen ein, liegt der reproduzierte Wert im richtigen Bereich.

Erneut konnte die enorme Verbesserung der Bindeaffinität von OpuAR zu Cholin anhand der beiden OpuAR-Mutanten R¹⁰⁰F und Y⁹⁴F R¹⁰⁰F gezeigt werden. Für die deutliche Verbesserung der K_D ist der Austausch der Aminosäure Arginin in den Aromaten Phenylalanin (AS-Position 100) verantwortlich. Wie bereits aus der Bachelorarbeit von Henkel (2010) hervorgeht, lässt sich auch aus den hier gezeigten Ergebnissen sicher folgern, dass es sich hierbei um die Bindetasche des Proteins handelt.

Es wurden in diesem Zusammenhang zwei weitere OpuAR-Mutanten erzeugt. Den Hinweis, dass die in diesen Mutanten ausgetauschten Aminosäuren ebenfalls an der Bindung des Liganden Cholin beteiligt sein könnten, erhielt man durch das Modell der GbsR *in silico* Kristallstruktur aus *B. subtilis* (Abbildung 6). Hier wurden zwei weitere aromatische Aminosäuren (F⁹⁵ und F⁹⁸) in der Nähe der vermutlichen Bindetasche entdeckt. Da an den entsprechenden Positionen im OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 andere Aminosäuren vorhanden sind, wurden diese analog zu denen von GbsR aus *B. subtilis* mutiert. In OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 befinden sich an den entsprechenden Positionen ein Tryptophan und die nicht aromatische Aminosäure Asparagin. Durch den Austausch der beiden Aminosäuren, in eine GbsR ähnliche Bindetasche, erwartet man eine verbesserte Bindeaffinität zum Liganden, da auch GbsR aus *B. subtilis* Cholin mit einer stärkeren Affinität binden kann (Nau-Wagner *et al.*, 2012) als OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911. Nicht zuletzt erwartet man dies auch, da in der OpuAR N⁹⁶F Mutante, die putative Bindebox um einen Aromaten erweitert wurde, der zusätzlich in Kation- π Interaktion mit dem Liganden treten kann (Dougherty, 1996). Es werden nun die beiden neu erzeugten Mutanten OpuAR W⁹³F und OpuAR N⁹⁶F im Fluoreszenzspektroskop analysiert. Auch von diesen beiden Proteinen werden die Bindeaffinitäten zu Cholin bestimmt (3.5.10). Die Sättigungskurven und Intensitätsänderung sind im Anhang (Abbildung 69 & 70) zu finden.

Auch diese Daten wurden zum Teil in einem von mir betreuten Praktikum von Ludmila Enz erarbeitet.

Das Protein OpuAR W⁹³F bindet Cholin mit einer K_D von 210 μM \pm 33 μM (Tabelle 14). Somit hat der Austausch des Tryptophans in ein Phenylalanin zu keiner Verbesserung der Bindeaffinität zu Cholin geführt. Dies war durchaus zu erwarten war, da es sich bei beiden Aminosäuren um Aromaten handelt. Beide können in Kation- π Interaktion mit dem Liganden treten (Dougherty, 1996).

Auch der Aminosäureaustausch der OpuAR N⁹⁶F Mutante zeigt keine verstärkte Bindung des Proteins zum Liganden (Tabelle 14). Diese Mutante besitzt eine K_D von 262 μM \pm 34 μM zu Cholin. Somit scheint diese Aminosäure in OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 keinen Einfluss auf die Bindung von Cholin zu haben. Durch den Austausch der nicht aromatischen Aminosäure in einen Aromaten wäre eine deutliche Verbesserung der K_D zu Cholin erwartet worden. Demnach scheint die Aminosäure nicht an der direkten Bindung des Liganden beteiligt zu sein. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aminosäure an dieser Position in der putativen Ligandenbindetasche eine stabilisierende Funktion besitzt.

Wie in Kapitel 4.6.5 gezeigt werden konnte, besitzt OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 neben Cholin noch zwei weitere Liganden. Aus diesem Grund soll überprüft werden, ob die bisher identifizierte aromatische Bindetasche auch Glycin Betain bindet. Dafür wurden alle vorhandenen OpuAR-Mutanten im Fluoreszenzspektroskop mit Glycin Betain vermessen. Die Messungen wurden wie in Kapitel 3.5.10 beschrieben durchgeführt. Die ermittelten Sättigungskurven und Intensitätsänderung dazu befinden sich im Anhang (Abbildung 69 & 70). Generell binden alle OpuAR-Mutanten das kompatible Solut Glycin Betain (Tabelle 14). Die Mutanten OpuAR W⁹³F, OpuAR N⁹⁶F, OpuAR Y⁹⁴F und auch die Doppelmutante OpuAR Y⁹⁴F R¹⁰⁰F zeigen die gleiche Bindeaffinität zu Glycin Betain wie für Cholin auf. Die Bindeaffinität der Doppelmutante (70 μM \pm 12 μM) zu Glycin Betain, im Vergleich zum OpuAR-Wildtyp (301 μM \pm 24 μM), ist ebenfalls dreifach stärker. Bei dieser Mutante wurde sowohl das Tyrosin⁹⁴ als auch das Arginin¹⁰⁰ in jeweils ein Phenylalanin ausgetauscht. Wird allerdings nur das Arginin¹⁰⁰ ausgetauscht, kann OpuAR R¹⁰⁰F Glycin Betain genauso gut binden, wie der Wildtyp. Da alle Mutanten Glycin Betain binden können, ist bewiesen, dass Glycin Betain auch in die Ligandenbindetasche in OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 gebunden wird.

4.7.2 Die Ligandenspezifität der aromatischen Bindetasche von GbsR-Typ Regulatoren

Anhand der vorherigen OpuAR-Mutanten, konnte gezeigt werden, dass scheinbar mehrere Aromaten an der Bindung eines Liganden durch einen GbsR-Typ Regulator beteiligt sind. Im Folgenden soll untersucht werden, wie stark die im Kristallstrukturmodell von GbsR gefundenen sechs Aromaten unter den GbsR-Typ Regulatoren konserviert sind. Dies wird anhand eines Vergleichs der Aminosäuresequenz überprüft (3.6). Dabei wird zum einen ein Sequenzvergleich der Transporter-Klasse (Abbildung 58; Anhang) und zum anderen der Synthese-Klasse (Abbildung 55; Anhang) erstellt.

Für die Synthese-Klasse kann beobachtet werden, dass nahezu alle GbsR-Typ Regulatoren, wie GbsR aus *B. subtilis* selbst, sechs Phenylalanine an den entsprechenden Positionen besitzen. Die drei Phenylalanine an Position F⁹⁵, F⁹⁹ und F¹⁰², ausgehend von GbsR, sind durchgängig in allen GbsR-Typ Regulatoren dieser Klasse konserviert. An den Positionen F⁹⁶, F⁹⁸ und F¹⁰³ kommen hauptsächlich Phenylalanine vor. In einigen wenigen GbsR-Typ Regulatoren befinden sich allerdings an diesen Positionen auch Tyrosine, Serine oder Alanine. Tritt eine andere Aminosäure in einem GbsR-Typ Regulator auf, ist dies immer nur an einer der sechs Positionen. Neben den sechs untersuchten Aminosäuren taucht noch eine weitere aromatische Aminosäure ganz in der Nähe der anderen auf. Es handelt sich hierbei um ein Tryptophan W¹⁰⁷, dass mit Ausnahme von vier GbsR-Typ Regulatoren, in allen weiteren Repressoren, konserviert ist. Dies und auch die Lage im Kristallstrukturmodell von GbsR aus *B. subtilis* (Abbildung 44) lässt vermuten, dass auch dieser Aromat vielleicht an der Ligandenbindung beteiligt ist.

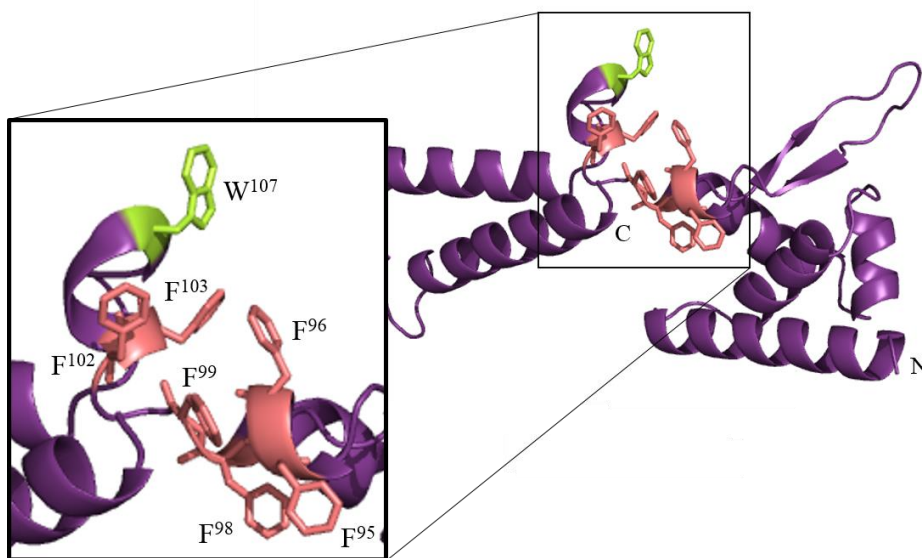


Abbildung 44: Kristallstrukturmodell von GbsR aus *B. subtilis* mit Vergrößerung der teils putativen aromatischen Ligandenbindebox.

In lachsfarben dargestellt, sind die bisher bekannten Phenylalanine aus. Das limonfarben markierten Tryptophan W¹⁰⁷ ist möglicherweise auch an der Bindung des Liganden Cholin involviert.

Im Gegensatz dazu stehen die Aminosäuren dieser Positionen der GbsR-Typ Regulatoren aus der Transporter-Klasse. Unter den sechs Aminosäuren befindet sich lediglich eine, die komplett in allen Mitgliedern der Transporter-Klasse konserviert ist. Hierbei handelt es sich um das F⁹⁷ ausgehend von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911. Tauchen an den beiden Positionen W⁹³, Y⁹⁴ und F¹⁰¹ andere Aminosäuren auf, so handelt es sich dabei grundsätzlich um einen anderen Aromaten. Bei W⁹³ sind neben dem hauptsächlich auftretenden Tryptophan, sowohl Phenylalanin, wie auch Tyrosine zu finden. In einigen wenigen Ausnahmen ist auch die nicht aromatische Aminosäure Lysin vorhanden. Für Y⁹⁴ sind es Phenylalanine oder Histidine und für F¹⁰¹ Tyrosine. Die übrigen Positionen N⁹⁶ und R¹⁰⁰ variieren vollständig. An Position N⁹⁶ liegen sogar bis zu sechs verschiedene Aminosäuren vor, die alle keine Aromaten sind. Auch anstatt des Arginin R¹⁰⁰ treten im Fall der Hälfte der GbsR-Typ Regulatoren nicht aromatische Aminosäuren auf. Auch das neu entdeckte Tryptophan (W¹⁰⁵) der Synthese-Klasse befindet sich in allen GbsR-Typ Regulatoren der Transporter-Klasse. Hier ist es sogar noch stärker konserviert als in der Synthese-Klasse.

4.8 Stabilität von gereinigten GbsR-Typ Regulatoren

4.8.1 Versuch der oligomeren Größenbestimmung von GbsR-Typ Regulatoren

Um eine Aussage über die native Größe der GbsR-Typ Regulatoren machen zu können, werden die gereinigten Proteine GbsR aus *B. subtilis*, OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 und CudC aus *S. xylosus* C2A nach der heterologen Expression in *E. coli* BL21 (3.5.3) und der Reinigung (3.5.6) auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen (3.5.9). Da davon ausgegangen wird, dass es sich bei den GbsR-Typ Regulatoren um ein Dimer handelt, wie es für MarR-Typ Regulatoren üblich ist (Wilkinson & Grove, 2006), wird die HiLoad Superdex 80pg verwendet. Somit sollten alle drei Protein mit C-terminalem Strep-Tag[®] eine Größe von ~44 kDa aufweisen. Anhand der Referenzproteine Rinderserum Albumin (66 kDa), einer Rinder Carboanhydrase (29 kDa) und dem Cytochrom C eines Pferdeherzens (12,4 kDa) wird zunächst eine Kalibrierungsgerade erstellt. Die resultierende Kalibrierungsgerade hat folgende Formel: $y = -0,0004x + 81,46$. Der dazugehörige Gelfiltrationslauf kann Abbildung 71 im Anhang entnommen werden.

Im Anschluss werden die drei zu testenden GbsR-Typ Proteine nacheinander auf die Säule gegeben.

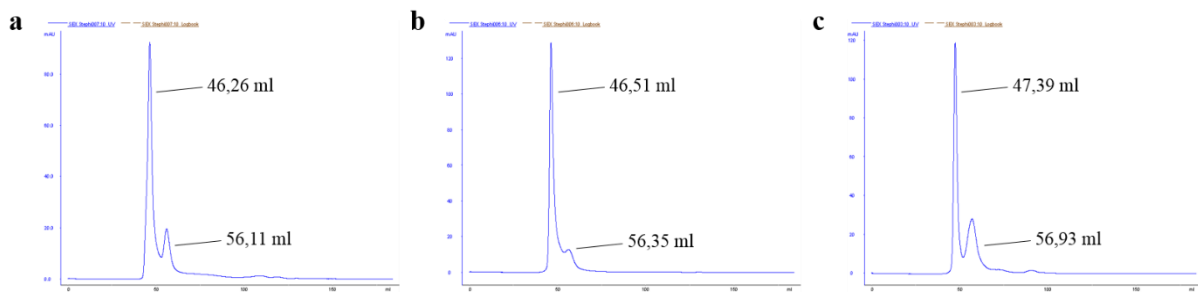


Abbildung 45: Gelfiltrationslauf von GbsR-Typ Regulatorproteinen.

Elutionspeaks von (a) GbsR aus *B. subtilis*, (b) OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 und (c) CudC aus *S. xylosus* C2A. Alle drei Proteine weisen zwei Peaks auf.

Bei allen drei Gelfiltrationsläufen sind jeweils zwei Peaks zu sehen (Abbildung 45). Dies deutet darauf hin, dass die GbsR-Typ Regulatoren in nicht nur einer Form vorliegen. Mit Hilfe der Ausgleichsgeraden und der Elutionsvolumen beider Peaks von durchschnittlich 46,70 ml (großer Peak) und 56,46 ml (kleiner Peak) kann das Molekulargewicht der Multimere errechnet werden (Abbildung 45). Der große Peak zeigt jeweils an, dass das jeweilige Protein eine Größe von 86,9 kDa hat. Aus dem kleineren Elutionspeak geht hervor, dass die zweite Form der Proteine 62,5 kDa groß ist. Widererwarten scheint es sich bei den GbsR-Typ Regulatoren nicht um einen Dimer zu handeln. Bei der ermittelten Größe des kleineren Peaks von ~63kDa liegt ein Trimer vor. Der größte Teil des Proteins scheint allerdings mindestens ein Tetramer sein zu. Genau lässt sich dies allerdings nicht mit der HiLoad Superdex 80pg bestimmen, da nur Proteine bis zu einer Größe von 80 kDa genau aufgetrennt werden können.

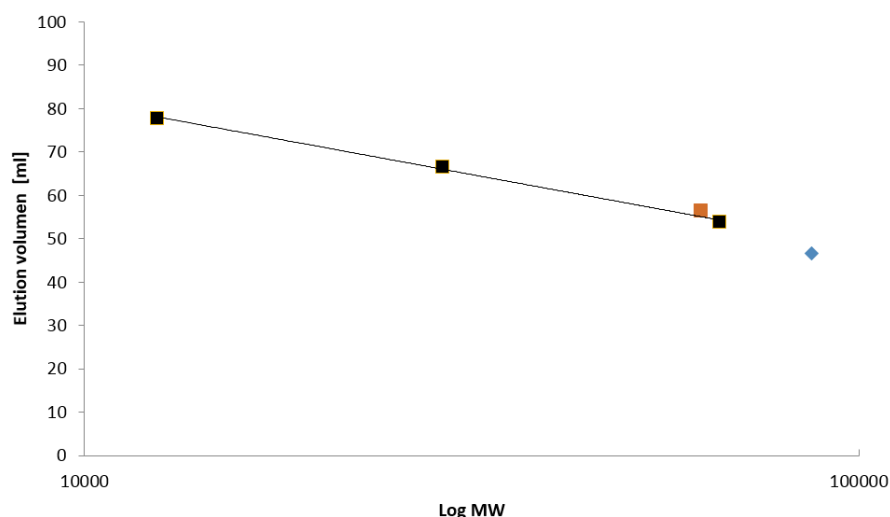


Abbildung 46: Standardgerade der Referenzproteine auf der HiLoad Superdex 80pg.

Anhand der Elutionsvolumen der Referenzproteine Rinderserum Albumin (66 kDa), einer Rinder Carboanhydrase (29 kDa) und dem Cytochrom C eines Pferdeherzens (12,4 kDa) kann eine Kalibrierungsgerade erstellt werden. Mit dieser kann die native Größe der GbsR-Typ Proteine berechnet werden. Da im Gelfiltrationslauf zwei Peaks zu sehen sind, tauchen im Diagramm ebenfalls zwei Punkte auf. Der blaue entspricht dem großen Peak, der Rote dem kleineren.

Aus diesem Grund wird stellvertretend für die anderen beiden Proteine mit dem gereinigten GbsR aus *B. subtilis* weitergearbeitet. Dieses Protein wird nun auf eine HiLoad Superdex 200pg aufgetragen, deren Aufschlussgröße bei >200 kDa endet (3.5.9). Zunächst werden wiederum drei Referenzproteine aufgetragen. Zu den zuvor verwendeten Markerproteinen Rinderserum Albumin (66 kDa) und Rinder Carboanhydrase (29 kDa) wird diesmal noch eine Alkoholdehydrogenase verwendet (150 kDa). Auch dieser Gelfiltrationslauf liegt im Anhang in Abbildung 72 vor. Aus der Kalibrierungsgerade geht folgende Formel hervor: $y = -0,0002x + 92,046$.

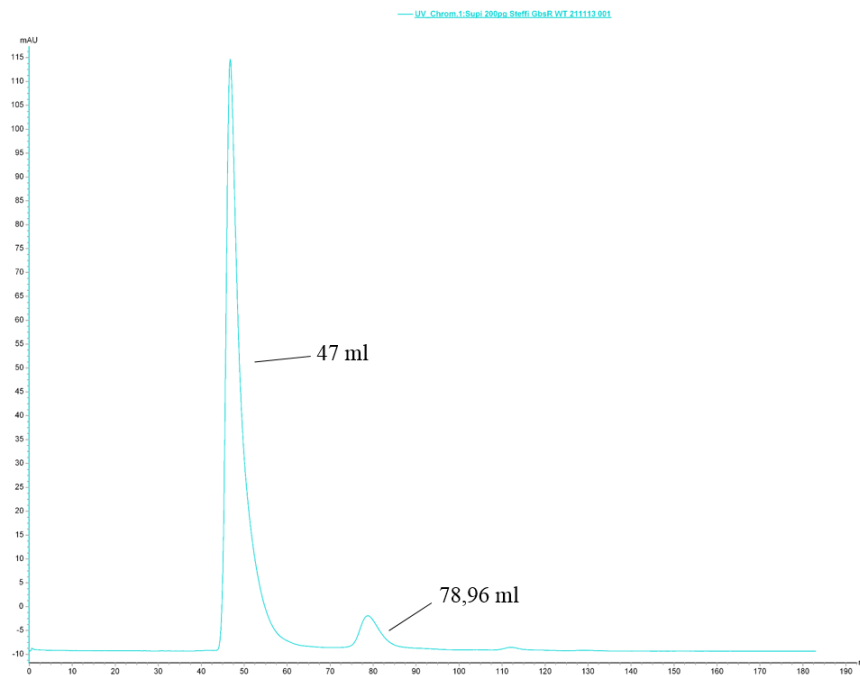


Abbildung 47: Gelfiltrationslauf von GbsR aus *B. subtilis*.

Dargestellt sind die Elutionspeaks von GbsR aus *B. subtilis*. Es sind erneut zwei Peaks zu sehen. Der größere von Beiden weist keine gleichmäßige Symetrie auf.

Erneut treten zwei Peaks im Gelfiltrationslauf von GbsR auf (Abbildung 47). Es liegen also erneut zwei Formen des Proteins vor. Aus den Elutionsvolumen lässt sich anhand der Kalibrierungsgeraden errechnen (Abbildung 48), dass der größte Teil des Proteins eine Größe von 225,23 kDa besitzt. Da auch dies außerhalb des Fassungsvermögens (<200 kDa) der verwendeten Säule liegt, wird vermutet, dass es sich hier um aggregiertes Protein handelt. Auch die Form des frühen Peaks lässt darauf schließen. Er liegt nicht symmetrisch vor, wie es für aktive und richtig gefaltete Proteine üblich ist. Dies ist beim etwa zehnfach kleineren, zweiten Peak der Fall. Dieser Teil des Proteins zeigt erneut, dass es sich bei dem nicht aggregiert vorliegenden Teil von GbsR mit einer Größe von 65,43 kDa um ein Trimer handeln muss. Bisher sind MarR-Typ Regulatoren in der Literatur allerdings nur als Dimere beschrieben.

(Wilkinson & Grove, 2006). Auch Kristallstrukturen wie beispielsweise die von MepR aus *Staphylococcus aureus* oder Mj223 aus *M. jannashii*, anhand dessen das Kristallstrukturmodell von GbsR aus *B. subtilis* erstellt wurde, zeigen den MarR-Typ Regulator als Homodimer (Birukou *et al.*, 2014; Nau-Wagner *et al.*, 2012; Ray *et al.*, 2003). Die *in vitro* gereinigten Proteine der hier untersuchten GbsR-Typ Regulatoren sind daher und wegen des großen Anteils an aggregiertem Protein höchst kritisch zu betrachten. Demnach sind auch die bisher vorläufigen EMSA Studien (Abbildung 61 - 65; Anhang; Durchführung wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben) der drei putativen Regulatoren, OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911, GbsR aus *B. subtilis* und CudC aus *S. xylosus* C2A nur sehr kritisch zu analysieren. Bei der Auswertung gilt es einerseits zu bedenken, dass 9/10 des eingesetzten Proteins aggregiert vorliegt und das übrige Protein nicht wie typisch für MarR-Typ Regulatoren als Dimer vorliegt. Es ist daher sehr unklar, ob die Bindung der DNA durch den jeweiligen Regulator tatsächlich so stattfindet. Möglicherweise entstehen auch unspezifische Bindungen der DNA durch aggregiertes Protein.

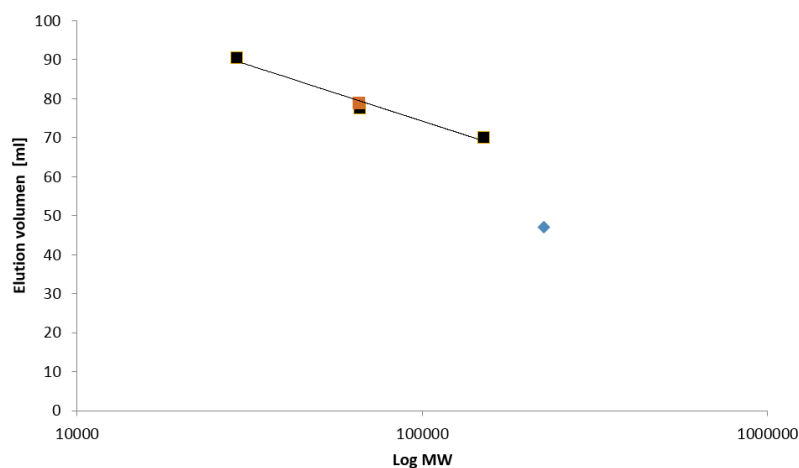


Abbildung 48: Standardgerade der Referenzproteine auf der HiLoad Superdex 200pg.

Anhand der Elutionsvolumen der Referenzproteine Alkoholdehydrogenase (150 kDa), Rinderserum Albumin (66 kDa) und einer Rinder Carboanhydrase (29 kDa) kann eine Kalibrierungsgerade erstellt werden. Mit dieser kann die native Größe der GbsR-Typ Proteine berechnet werden. Da im Gelfiltrationslauf zwei Peaks zu sehen sind, tauchen im Diagramm ebenfalls zwei Punkte auf. Der blaue entspricht dem großen Peak, der Rote dem kleineren.

4.8.2 Produktion von GbsR im *E. coli* ArcticExpress (DE3) RIL

Wie aus den Daten der Size exclusion chromatographie hervorgeht, liegt nur rund 1/10 von GbsR aus *B. subtilis* nach der Reinigung als nicht aggregiertes Protein vor. Aufgrund der sehr ähnlichen Gelfiltrationsläufe mit der HiLoad Superdex 80pg von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 und CudC aus *S. xylosus* C2A, kann davon ausgegangen werden, dass beide Proteine

ebenfalls nach der Reinigung zum größten Teil inaktiv vorliegen. Um einige weitere Experimente mit *in vitro* gereinigtem Protein durchzuführen, die weniger kritisch betrachtet werden müssen, wird versucht, das Verhältnis an aggregiertem Protein zu richtig gefaltetem Protein zu verändern. Dafür wird GbsR in einem anderen *E. coli* Stamm überproduziert (3.5.3). Es handelt sich hierbei um den Stamm *E. coli* ArcticExpress (DE3) RIL. Dieser hat zum einen den Vorteil, dass er auch bei sehr geringen Temperaturen wächst, sodass auch die Faltung des GbsR langsamer, aber dafür genauer durchgeführt wird. Zum anderen besitzt dieser Stamm ein Chaperon, das bei der korrekten Faltung des GbsRs hilft. Die anschließende Reinigung des GbsR mit C-terminalem Strep-Tag®II erfolgt wie zuvor (3.5.6).

Um tatsächlich zu beweisen, dass es sich bei dem hier produzierten GbsR um aktives Protein handelt, wird das Eluat aufgefangen und das enthaltene GbsR geprüft. In fluoreszenzspektroskopischen Messungen sollen die Bindeaffinität von GbsR zu Cholin aus den Daten von Nau-Wagner *et al.*, (2012) reproduziert werden. Vorgegangen wird hierbei wie in Kapitel 3.5.10 beschrieben.

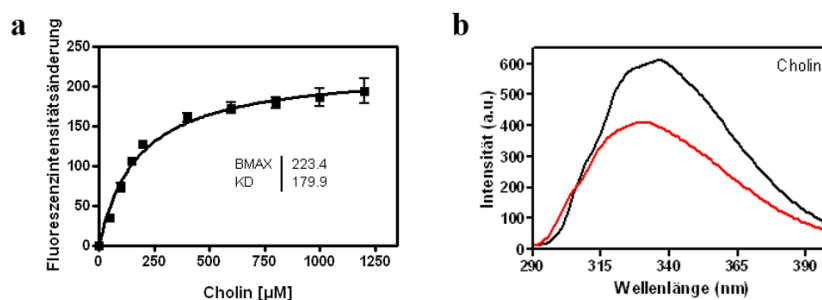


Abbildung 49: Sättigungskurve und Intensitätsänderung von im *E. coli* ArcticExpress (DE3) RIL produziertem GbsR aus *B. subtilis*.

(a) GbsR bindet Cholin mit einer K_D von $180 \mu\text{M} \pm 20 \mu\text{M}$. (b) zeigen die Intensitätskurven ohne (schwarz) und mit 1,2 mM Cholin (rot).

Das im *E. coli* ArcticExpress (DE3) RIL produzierte GbsR bindet Cholin mit einer K_D von $180 \mu\text{M} \pm 20 \mu\text{M}$ (Abbildung 49). Veröffentlicht ist eine Bindeaffinität von $165 \mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$ (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Werden die Standardabweichungen beider Werte berücksichtigt, konnten die Daten klar reproduziert werden. Es ist damit bewiesen, dass das hier produzierte GbsR Cholin mit der gleichen Affinität bindet wie das im *E. coli* BL21 produzierte.

Nach der Reinigung und anschließenden fluoreszenzspektroskopischen Überprüfung wird GbsR erneut auf die Anwesenheit von Aggregaten mit der HiLoad Superdex 200pg untersucht.

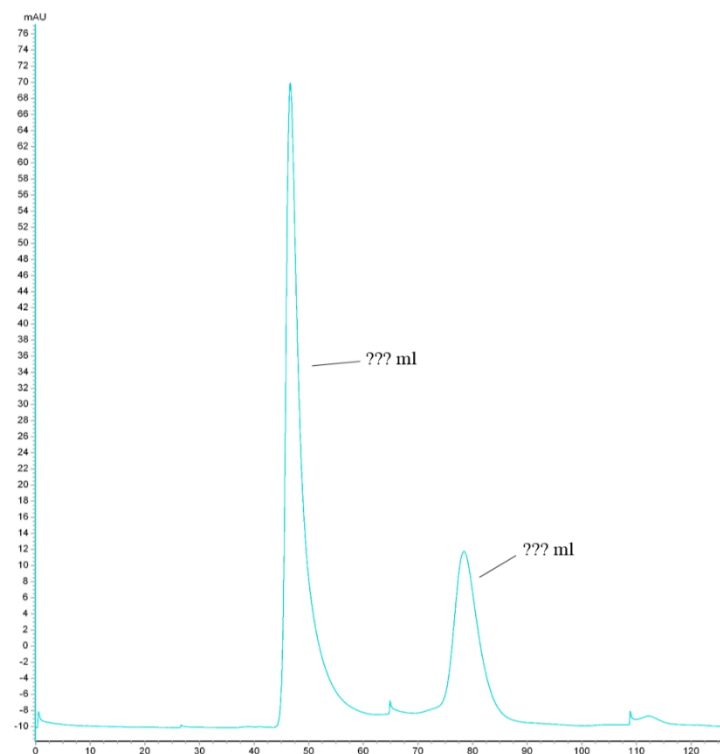


Abbildung 50: Gelfiltrationslauf von im *E. coli* ArcticExpress (DE3) RIL produziertem GbsR aus *B. subtilis*.

Zu sehen sind die Elutionspeaks von GbsR aus *B. subtilis*. Es sind erneut zwei Peaks zu sehen. Der größere von Beiden weist erneut keine gleichmäßige Symmetrie auf. Etwa ein Viertel des Proteins liegt aggregiert vor.

Nach der Überproduktion im *E. coli* ArcticExpress (DE3) RIL liegt ein weit größerer Teil des GbsR aus *B. subtilis* als nicht aggregiertes Protein vor (Abbildung 50). Der Anteil an aggregiertem Protein ist deutlich verringert, wie anhand der Elutionspeaks erkannt werden kann. Er ist jetzt nur noch circa viermal so hoch anstatt wie zuvor zehnfach. Dies lässt darauf schließen, dass der Produktionsstamm ausschlaggebend für das Verhältnis an Aggregaten zu nicht aggregiertem Protein ist.

4.8.3 Produktion von GbsR in *Bacillus megaterium*

Aus dem verbesserten Verhältnis von aggregiertem Protein zu aktivem Protein nach der Produktion in *E. coli* ArcticExpress (DE3) RIL, lässt sich schlussfolgern, dass der Produktionsstamm entscheidend ist. Aus diesem Grund wird versucht, das Protein direkt in einem *Bacillus*-Stamm überzuproduzieren. Da *B. megaterium* selbst ein eigenes GbsR-Typ Protein mit genomisch angrenzenden Glycin Betain Synthesegenen besitzt, wird GbsR aus *B. subtilis* als nächstes in *B. megaterium* überproduziert. Die Überproduktion erfolgt nach dem in Kapitel 3.5.4 beschriebenen, bereits etablierten System für die heterologe Expression in

B. megaterium. Anschließend wird GbsR wie zuvor gereinigt (3.5.6). Das gereinigte Protein wird zur Untersuchung auf Aggregate auf die HiLoad HiLoad Superdex 200pg aufgetragen (3.5.9).

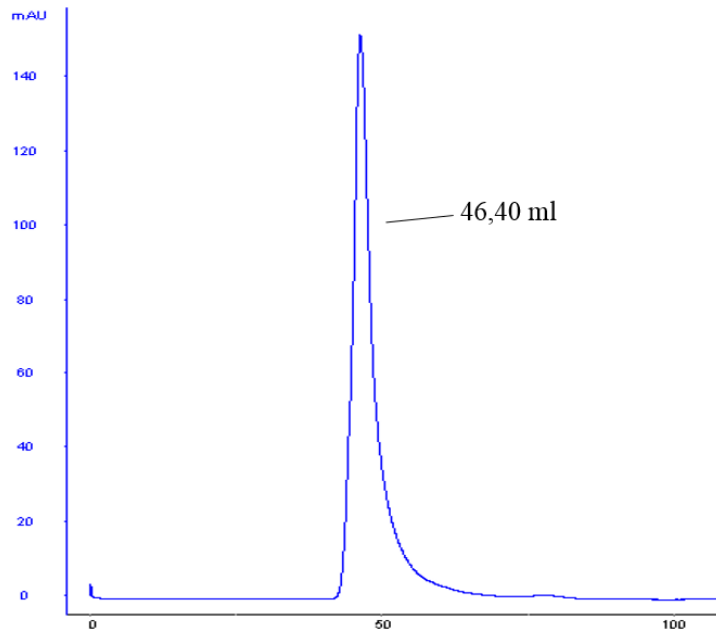


Abbildung 51: Gelfiltrationslauf von im *B. megaterium* produziertem GbsR aus *B. subtilis*.

Zu sehen ist lediglich ein Elutionspeak von GbsR aus *B. subtilis*. Dieser weist erneut keine gleichmäßige Symetrie auf. Das komplette vorhandene GbsR liegt aggregiert vor.

Die Überproduktion von GbsR aus *B. subtilis* in *B. megaterium* bringt keine Verbesserung. Aus Abbildung 51 kann entnommen werden, dass GbsR jetzt ausschließlich aggregiert vorliegt. Lediglich der typische unsymmetrische erste Peak mit einem Elutionsvolumen von 46,40 ml ist zu sehen. Es scheint demnach nicht ausschließlich der Produktionsstamm zu sein, der sich auf das Verhältnis zwischen nicht aggregiertem GbsR und aggregiertem GbsR auswirkt.

4.8.4 Überproduktion von GbsR aus *B. subtilis* mit Maltosebindeprotein als Fusionsprotein

Wie bisher gezeigt werden konnte, ist für das Verhältnis zwischen aktivem und aggregiert vorliegendem Protein nicht nur der Produktionsstamm ausschlaggebend. Ein weiterer sich negativ auswirkender Faktor könnte der C-terminale Strep-Tag®II sein, der die ursprünglich geplante Faltung des Proteins verschlechtert. Aus diesem Grund wird dem Protein, statt eines weiteren Tags, das Maltosebindeprotein (MBP) N-terminal angehängen. Das zusätzliche Protein soll helfen, GbsR richtig zu falten. Zusammen haben beide Proteine eine Größe von 62 kDa. Die Überproduktion des Fusionsprodukts erfolgt wie gewohnt in einem *E. coli* BL21 Stamm (3.5.5). Bei der Reinigung diente das Maltosebindeproteins als Tag, sodass über eine

Amylose Säule gereinigt wurde (3.5.7). Auch das GbsR-MBP-Fusionsprotein wird über die HiLoad Superdex 200pg aufgetrennt.

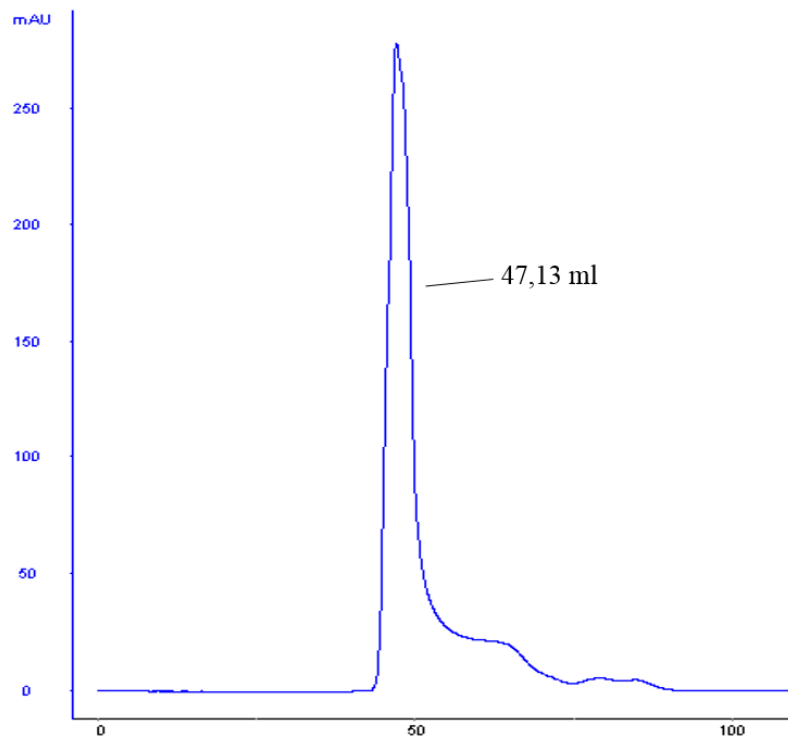


Abbildung 52: Gelfiltrationslauf des GbsR-MBP-Fusionsproteins.

In der Abbildung dargestellt ist der Gelfiltrationslauf des GbsR-Maltosebindepotein-Fusionsprotein. Auch hier ist lediglich ein Elutionspeak zu sehen. Dieser weist keine gleichmäßige Symetrie auf. Das Fusionsprotein ist ebenfalls aggregiert.

Selbst mit Maltosebindepotein liegt GbsR aus *B. subtilis* nur in aggregierter Form vor. Im Gelfiltrationslauf (Abbildung 52) ist erneut nur ein unsymmetrischer Peak mit einem Elutionsvolumen von 47,13 ml zu sehen. Anhand der Kalibrierungsgeraden wird eine Größe von >200 kDa errechnet. Damit ist auch ausgeschlossen, dass der C--terminale Strep-Tag®II ein störender Faktor bei der Faltung von GbsR-Typ Regulatoren ist.

5. Diskussion & Ausblick

5.1 GbsR-Typ Regulatoren regulieren osmotisch relevante Gene in *Bacteria*

Zum Schutz vor osmotischem Stress nimmt das Bodenbakterium *B. subtilis* kompatible Solute über spezifische Transporter in die Zelle auf (Bremer, 2001). Außer der direkten Aufnahme von kompatiblen Soluten besitzt *B. subtilis* die Möglichkeit kompatible Solute zu synthetisieren. Wie z. B. das Osmoprotektivum Glycin Betain, das aus dem Vorläufermolekül Cholin hergestellt wird. Die Gene der Glycin Betain Synthese sind in *B. subtilis* in einem Operon organisiert. Neben dem Operon befindet sich das kodierende Gen des Cholin-sensitiven Regulators GbsR, der die Expression des angrenzenden *gbsAB*-Operons in *B. subtilis* reguliert (Nau-Wagner *et al.*, 2012).

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten zeigen, dass GbsR-Typ Regulatoren wie GbsR aus *B. subtilis* weit verbreitet innerhalb der Domäne *Bacteria* sind und auch innerhalb der *Archaea* auftauchen (4.1.1). Sie können in drei Klassen unterteilt werden. Bei den GbsR-Typ Regulatoren zweier dieser Klassen handelt es sich um Regulatoren, die in die osmotische Regulation involviert sind (4.1.2; 4.1.4). In der osmotisch-unabhängigen-Klasse tauchen lediglich GbsR-Typ Regulatoren auf, die keinerlei Bezug zur Regulation unter osmotischen Stress aufweisen. Aus dieser Gruppe ist der MarR-Typ Regulator Mj223 aus *M. jannaschii* bekannt, der möglicherweise die Regulation von Resistenzgenen gegen Antibiotika übernimmt (Ray *et al.*, 2003). *M. jannaschii* zählt zu den insgesamt 20 *Archaea*, in denen GbsR-Typ Regulatoren gefunden wurden. In der osmo-unabhängigen-Klasse tauchen neben den *Archaea* noch GbsR-Typ Regulatoren aus der Domäne der *Bacteria* auf. Allerdings gehören sie unterschiedlichen Phyla an, wie beispielweise den *Verruimicrobia*, den *Preoteobacteria* oder den *Bacteroides*. Nur zwei GbsR-Typ Regulatoren der osmotisch-unabhängigen-Klasse, der insgesamt 198, kommen in *Firmicutes* vor (4.1.3). Das steht im kompletten Gegenteil zu den beiden osmotisch-abhängigen Klassen. In diesen taucht der GbsR-Typ Regulator mit Ausnahme eines *Proteobacterium*s nur in *Firmicutes* und somit ausschließlich in der Domäne *Bacteria* auf (4.1.2; 4.1.4).

Die osmotisch-abhängigen GbsR-Typ Regulatoren können, wie bereits erwähnt, in zwei weitere Klassen unterteilt werden. Zum einen in die Transporter-Klasse und zum anderen in die Synthese-Klasse (4.1.2; 4.1.4). Diese Aufteilung orientiert sich dabei an der Genumgebung der GbsR-Typ Regulatoren. Eine solche Verteilung wurde bereits 2012 von Nau-Wagner *et al.* beobachtet.

Eine der beiden osmotisch-abhängigen Klassen zeichnet sich dadurch aus, dass angrenzend an das Gen des GbsR-Typ Regulators in den meisten Bakterien die Glycin Betain Synthesegene liegen. Aus der hier definitierten Synthese-Klasse wurden bereits mehrere dieser Synthesegene aus verschiedenen Bakterien charakterisiert. Eine funktionelle Analyse der Glycin Betain Synthesegene wurde bereits in *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1996, 1997), *H. halophilus* (Burkhardt *et al.*, 2009) und *S. xylosus* C2A (Rosenstein *et al.*, 1999) durchgeführt.

Für die Regulation dieser Gene ist in *B. subtilis* der Repressor GbsR zuständig. Das kodierende Gen grenzt direkt an das *gbsAB*-Operon an (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Durch die Bindung im Promotorbereich vor dem Operon wird dabei die Expression reprimiert.

Die Expression der Synthesegene aus *S. xylosus* C2A wird vermutlich ebenfalls durch den GbsR-Typ Regulator CudC reguliert, wie in bioinformatischen Analysen nachgewiesen werden konnte (4.4). Auch das kodierende Gen dieses Regulators befindet sich direkt angrenzend an die Glycin Betain Synthesegene.

Wie bereits von Nau-Wagner *et al.* (2012) beobachtet, scheinen fast alle *Staphylococci* dieser Klasse, zusätzlich zum *gbsAB*-Operon, ein Gen für einen Einkomponenten-Transporter zu besitzen (4.1.4). Dieser wurde in *S. xylosus* C2A bereits als BCCT Transporter für Cholin charakterisiert (Rosenstein *et al.*, 1999).

Neben den *gbsR* ähnlichen Genen der Transporter-Klasse liegen ausschließlich Gene für ABC-Transporter. Aufgrund der Spezifität der Transporter kann diese Klasse in zwei Untergruppen geteilt werden (4.1.2). Zur OpuA-Untergruppe gehört OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911. OpuAR reguliert die Gene des OpuA-Typ Regulators (4.6.3). Dazu bindet der GbsR-Typ Regulator in der intergenen Region von *opuAR* und *opuAA* an die DNA.

Aus der OpuB/OpuC-Untergruppe wurde bereits der GbsR-Typ Regulator OpuCR aus *B. subtilis* näher analysiert. Er ist u. a. für die transkriptionelle Regulation des OpuC Transporters zuständig. Das GbsR-Typ Protein, dessen Gen neben dem *opuC*-Operon organisiert ist, bindet bei der Repression der Gene in der intergenen Region (Lee *et al.*, 2013). Die meisten detektierten, angrenzenden Operone beider osmotisch-abhängiger Klassen sehen analog zu denen aus *B. subtilis* aus. Dennoch konnten in jeder der beiden Klassen Operone gefunden werden, denen Teile des üblichen Genclusters fehlen. Teilweise tauchen sogar Operone mit mehreren Genen als üblich auf (4.1.2; 4.1.4). Da die Mehrheit an Operonen analog zu denen aus *B. subtilis* annotiert ist, wird davon ausgegangen, dass die unterschiedlichen Varianten beim horizontalen Gentransfer oder aus einer Genduplikation entstanden sind.

Unter osmotischem Stress scheint sich die Regulation verschiedener osmotisch relevanter Gene anhand eines Regulators auf transkriptioneller Ebene bewährt zu haben. Einige Repressoren,

die für die transkriptionelle Regulation von osmotisch-abhängigen Genen zuständig sind, wurden bisher bereits charakterisiert. Allerdings unterscheiden sich diese in verschiedenen Eigenschaften. BusR aus *Lactococcus lactis* beispielsweise reguliert, wie auch der GbsR-Typ Regulator OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 die Gene des Glycin Betain spezifischen Transporters (Romeo *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu OpuAR wird dieser Repressor allerdings durch ionische Kräfte aktiviert (Romeo *et al.*, 2007). Außerdem handelt es sich bei BusR um einen Regulator der GntR Familie, während OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 zur Familie der MarR-Typ Regulatoren zählt.

Ein Regulator, der ebenfalls zu MarR-Typ Familie gehört, ist CosR (compatible solute regulator) aus *V. cholerae*. Wie GbsR aus *B. subtilis* ist CosR aus *V. cholerae* für die transkriptionelle Regulation eines Aufnahmesystems und eines Transporters für kompatible Solute zuständig (Nau-Wagner *et al.*, 2012; Shikuma *et al.*, 2013). CosR reguliert dabei u. a. die Gene des OpuD Transporters für kompatible Solute und die der Ectoin Synthese. Dabei tritt eine erhöhte Expression der Aufnahme- und Synthesegene unter steigender Salinität auf. Interessanterweise reagiert auch dieser Regulator auf Ionenstärke und nicht wie GbsR aus *B. subtilis* auf ein kompatibles Solut (Shikuma *et al.*, 2013).

Besonders unter dem Phylum *Firmicutes* scheint der GbsR-Typ Regulator, der osmotisch-abhängige Gene reprimiert, weit verbreitet zu sein. Bei den GbsR-Typ Regulatoren handelt es sich um eine eigene Familie der MarR-Typ Regulatoren, die hier definiert und genauer charakterisiert werden konnte.

5.2 Zusammenspiel mehrere GbsR-Typ Regulatoren

B. subtilis besitzt mehrere Aufnahmesysteme für kompatible Solute und kann zudem kompatible Solute synthetisieren, wenn sie unter osmotischem Stress benötigt werden (Kempf & Bremer, 1998; Wood *et al.*, 2001). Die Regulation dieser Systeme ist sehr komplex, da immer im richtigen Moment das benötigte kompatible Solut transportiert oder synthetisiert werden muss. Liegt beispielsweise unter Hochsalzbedingungen Cholin in direkter Umgebung des Bakteriums vor, wird der Cholin-spezifische Transporter OpuB benötigt, um möglichst große Mengen in kurzer Zeit in die Zelle zu befördern (Bremer, 2001; Kappes *et al.*, 1999). Da Cholin nur ein Vorläufermolekül des kompatiblen Soluts Glycin Betain ist, wird Cholin in der Zelle zu Glycin Betain oxidiert (Boch *et al.*, 1996, 1997). Damit nur so viel Glycin Betain von der Zelle produziert wird, wie benötigt wird, werden die kodierenden Operone beider Systeme durch den Repressor GbsR transkriptionell reguliert (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Wie kürzlich

herausgefunden wurde, hat in die Regulation des *opuB*-Operons zudem noch ein weiterer GbsR-Typ Regulator Einfluss. Die Rede ist von OpuCR, der neben dem kodierenden Operon des OpuB Transporters auch das des OpuC Transporters reguliert (Lee *et al.*, 2013). Anhand dieses Mechanismus wird die Komplexität der Regulation deutlich. Bei der Regulation eines Operons scheinen oft mehrere Regulatoren beteiligt zu sein. Dieses Phänomen scheint unter den GbsR-Typ Regulatoren typisch zu sein, da nicht nur in *B. subtilis* mehrere GbsR-Typ Regulatoren vorkommen. In den bioinformatischen Studien dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 23 der insgesamt 147 Bakterien der beiden osmotisch-abhängigen Klassen mehr als ein *gbsR* ähnliches Gen haben. Auffällig dabei ist, dass 87 % der Bakterien, die ein GbsR-Typ Regulator der OpuB/OpuC-Untergruppe aufweisen noch einen weiteren GbsR-Typ Regulator aus der Synthese-Klasse besitzen (4.1.5). Vermutlich besteht in diesen Bakterien ebenfalls ein Zusammenspiel zwischen den Regulatoren, wie es oben für GbsR und OpuCR aus *B. subtilis* beschrieben ist. Dies könnte in zukünftigen Arbeiten näher untersucht werden. Dabei müsste die Genexpression verschiedener osmotisch-abhängiger Gene in An- und Abwesenheit von GbsR-Typ Regulatoren in einem Organismus überprüft werden.

5.2.1 Getrennte Bindemotive für OpuCR und GbsR vor dem *opuB*-Operon

OpuCR zeigt einen reprimierenden Einfluss auf die Expression des *opuB*-Operons in *B. subtilis* unter osmotischem Stress. Bei der Repression des Operons bindet OpuCR an die DNA der *opuBA*-Promotorregion. Das Bindemotiv von OpuCR liegt dabei direkt auf der -35 Region des SigA-Promotors. Eine Repression durch OpuCR auf das *opuB*-Operon konnte bisher nur in Abwesenheit von GbsR beobachtet werden (Lee *et al.*, 2013). Warum dies so ist, kann vermutlich anhand eines in dieser Arbeit erstellten Sequenzvergleichs der Promotorregionen von *gbsA* und *opuBA* geklärt werden (Abbildung 24; Ergebnisse). Darin zeichnet sich ab, dass GbsR ein eigenes Bindemotiv vor *opuBA* besitzt, das deutlich weiter stromabwärts zum Bindemotiv von OpuCR liegt. Somit ist die An- oder Abwesenheit von GbsR letztlich immer entscheidend für die Expression von *opuB*, wie Lee *et al.* (2013) bereits beobachteten. Im Modell der Regulation des *opuB*-Operons durch OpuCR und GbsR (Abbildung 53) ist dargestellt, was dies für verschiedene Situationen der Zelle bedeutet. Liegt kein Salzstress vor, findet nur eine geringe Expression der *opuB*-Gene statt, da sowohl OpuCR als auch GbsR an die DNA binden. Beide blockieren die DNA für die RNA-Polymerase. In Anwesenheit von Salz löst sich OpuCR von der DNA. Da GbsR allerdings stromabwärts der -35 und -10 Region bindet, wird die RNA-Polymerase von dem "road-block" GbsR "ausgebremst". Erneut werden die Gene des *opuB*-Operons nicht exprimiert. In Anwesenheit von Cholin und Salz löst sich

GbsR von der DNA (Nau-Wagner *et al.*, 2012), sodass keiner der beiden Repressoren mehr an die DNA binden kann und folglich die Expression von *opuB* stattfinden kann. Da OpuCR laut Lee *et al.* (2013) nicht Cholin-spezifisch ist, löst er sich ohne die Gegenwart von Salz nicht von der DNA. Obwohl GbsR in Anwesenheit von Cholin nicht an die DNA bindet, findet aufgrund von OpuCR keine Expression des *opuB*-Operons statt. Es wird folglich kein Cholin über OpuB in die Zelle transportiert. Ohne Salzstress der Zelle ist dies auch nicht notwendig. Die Synthese des Transporters und die Aufnahme von Cholin in die Zelle würde das Bakterium nur unnötig Energie kosten.

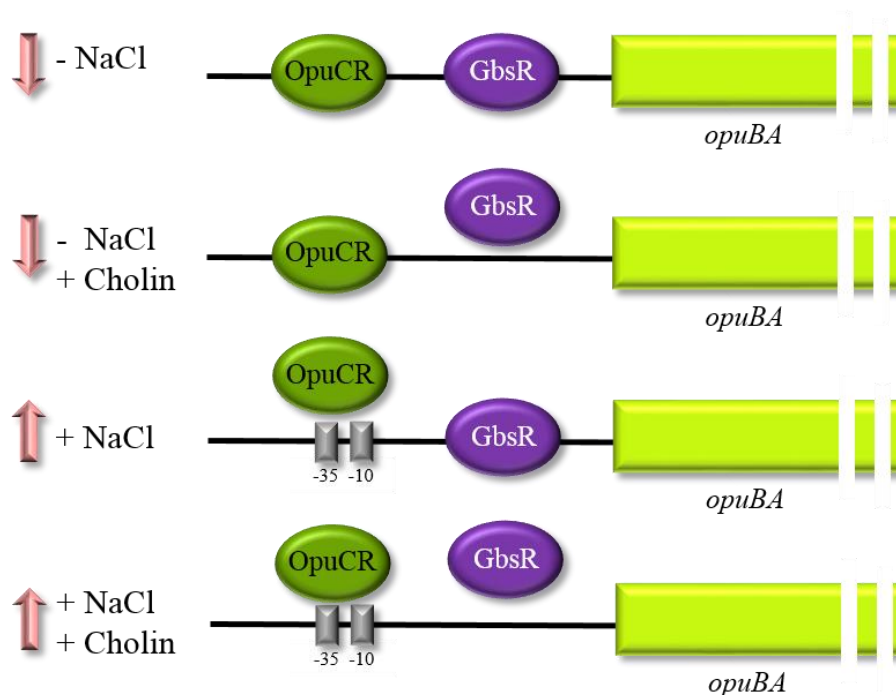


Abbildung 53: Modell der Regulation des *opuB*-Operons durch OpuCR und GbsR in *B. subtilis*. Ohne Salz werden die Gene des *opuB*-Operons nicht exprimiert, da beide GbsR-Typ Regulatoren die Transkription durch die RNA-Polymerase verhindern. In Anwesenheit von Salz löst sich OpuCR von der DNA. Allerdings wird die RNA-Polymerase durch den "road-block" GbsR aufgehalten. Liegt zusätzlich Cholin in der Zelle vor, löst sich auch GbsR von der DNA und die Gene des *opuB*-Operons können exprimiert werden. Ohne Salzstress aber in Anwesenheit von Cholin ist ebenfalls keine Expression möglich, da OpuCR an die DNA bindet.

Unter Anwesenheit von Salz ist außerdem die Aktivierung des Aktivatorproteins RemA ("regulator of extracellular matrix genes") für die Expression von *opuB* notwendig. Dies konnte in einem Microarray von Winkelmann *et al.* (2013) gezeigt werden. Dabei stellte sich heraus, dass RemA neben den Biofilmgene auch die Expression verschiedener osmotisch-abhängiger Gene, zu denen auch *opuB* zählt, in *B. subtilis* aktiviert. Die Expression der Gene wird dabei durch die Bindung von RemA an die DNA aktiviert. Das Bindemotiv von RemA befindet sich

noch weiter stromaufwärts des OpuCR Bindemotivs vor *opuB* (Lee *et al.*, 2013; Winkelman *et al.*, 2013; Hoffmann, unveröffentlicht).

Im Modell nicht berücksichtigt ist, die Beobachtung von Lee *et al.* (2013), dass Cholin selbst in Abwesenheit beider GbsR-Typ Regulatoren einen reprimierenden Effekt auf die Genexpression hat. Vermutlich wird in Anwesenheit von Salz und Cholin so dafür gesorgt, dass trotz der fehlenden Regulatoren, dennoch die Zufuhr durch OpuB von Cholin reguliert werden kann. Möglicherweise handelt es sich hier auch um einen Mechanismus, der die Feinabstimmung der *opuB*-Genexpression regelt. Für die Expression des *opuA*-Operons konnte ein solcher Mechanismus mit Glycin Betain bereits bestätigt werden. Bei steigender intrazellulärer Konzentration des kompatiblen Soluts wurde eine fallende *opuA*-Expression beobachtet. Wie dies jedoch genetisch vermittelt wird ist unklar (Hoffmann *et al.*, 2013). Es sollte demnach überprüft werden, ob es sich tatsächlich um einen Cholin-spezifischen Effekt handelt der von Lee *et al.* (2013) beobachtet wurde. Möglicherweise ist dieser Effekt durch Glycin Betain begründet, dass in der Zelle aus Cholin synthetisiert wurde.

Das vorgeschlagene Modell wird zudem dadurch gestützt, dass sich das GbsR-Typ Regulator-Bindemotiv entsprechend seiner Zuordnung in die hier bioinformatisch definiterten Klassen in der Promotorregion befindet. Wie GbsR aus *B. subtilis* zählt auch der GbsR-Typ Regulator CudC aus *S. xylosus* C2A zur hier definierten Synthese-Klasse. Auf der Suche nach dem möglichen Bindemotiv, konnte festgestellt werden, dass das Bindemotiv ebenfalls, wie das von GbsR aus *B. subtilis* höchstwahrscheinlich stromabwärts der -35 und -10 Region befindet (4.3). Demnach würde auch dieser GbsR-Typ Regulator als “road-block“ fungieren. Für die GbsR-Typ Regulatoren der Transporter-Klasse konnte bioinformatisch gezeigt werden, dass das Bindemotiv auf der -35 Region des Promotors liegt, wie es für OpuCR bereits bekannt ist (Lee *et al.*, 2013). Auch die Reporterstudien der *opuAA*-Promotorregion aus *B. infantis* NRRL B-14911 deuten darauf hin, dass das OpuAR Bindemotiv direkt auf der -35 Region liegt (4.6.3). Wird angenommen, dass die Bindemotive der beiden Klassen tatsächlich so positioniert liegen, wie hier exemplarisch für je einen Regulator jeder Klasse gezeigt, ist ein Zusammenspiel von GbsR und OpuCR wie oben vorgestellt durchaus denkbar.

Dass das Bindemotiv von MarR-Typ Regulatoren sowohl auf der -35 Region wie auch stromabwärts davon liegen kann ist bereits bei dem MarR-Regulator aus *E. coli* bekannt. Dabei besitzt MarR zwei Bindestellen vor dem *marRAB*-Operon. Ein MarR Bindemotiv liegt dabei direkt auf der -35 und -10 Region und das zweite stromabwärts des Transkriptionsstart noch vor *marR* (Aleksun & Levy, 1997; Martin & Rosner, 1995). In diesem Fall bindet allerdings an beide Bindestellen derselbe Repressor. Ein Regulon, bei dem zwei Repressoren an

verschiedene Bindemotive vor einem Operon binden, konnte bei Literaturrecherchen nicht ausfindig gemacht werden. Meist konkurrieren zwei Repressoren um dasselbe Bindemotiv wie im Fall von LmrA und YxaF aus *B. subtilis* (Hirooka *et al.*, 2007). Liegen zwei Bindemotive vor einem Operon, an die verschiedene Regulatoren binden, handelt es sich meist um einen Repressor und einen Aktivator. Dabei liegt das Aktivator-Bindemotiv meist stromaufwärts der -35 Region, wie es auch im Fall von MarA aus *E. coli* der Fall ist (Aleksun & Levy, 1997; Martin & Rosner, 1995).

Um das hier vorgeschlagene Modell des Regulons tatsächlich zu bestätigen, ist es notwendig, das in dieser Arbeit *in silico* gefundene GbsR Bindemotiv vor *opuBA* tatsächlich zu identifizieren. Dies könnte anhand einer *opuBA*-Reporterfusion, bei der das vorhergesagte GbsR Bindemotiv deletiert wurde, überprüft werden. Ebenfalls denkbar ist ein EMSA mit der *opuBA*-Promotorregion, bei der ebenfalls die entsprechende Region zuvor deletiert wurde. Aufgrund des nach der Reinigung instabil vorliegenden GbsRs, ist derzeit ein Footprint zur genauen Detektion der Basen mit denen GbsR in Interaktion tritt, nicht möglich.

Für die Bestätigung, dass Cholin in Abwesenheit von OpuCR und GbsR einen “fine tuning“-Effekt auf die Expression von *opuB* hat, sollte eine *opuBA*-Reporterfusion bei verschiedenen Salzkonzentrationen untersucht werden. Dabei sollte ein *gbsR*⁻- und *opuCR*-Stamm verwendet werden.

5.3 GbsR-Typ Regulation durch Protein-DNA-Interaktion

5.3.1 GbsR-Typ Regulatoren binden an palindromische Region

Bei der transkriptionellen Regulation des *opuC*- und *opuB*-Operons bindet OpuCR aus *B. subtilis* direkt an die DNA. Dies konnte anhand eines EMSA von Lee *et al.* (2013) gezeigt werden. Sie konnten außerdem eine Region eingrenzen, in der die Bindung stattfindet. Es handelt sich um folgenden Sequenz: -TTGTAAA-N₈-TTTACAA-. Die Sequenz des Bindemotivs ist ein perfektes Palindrom. Für MarR-Typ Regulatoren ist die Bindung an eine palindromische Region typisch (Wilkinson & Grove, 2006). Auch für den Repressor GbsR, der an die beiden Operone *gbsAB* und *opuB* bindet (Nau-Wagner *et al.*, 2012), konnte der Bereich an dem eine Interaktion zwischen Protein und DNA stattfindet vor *gbsA* eingegrenzt werden (4.2.1). Es handelt sich bei der Sequenz -TTAAAT-N₄-ATTTAA- ebenfalls um ein perfektes Palindrom. Dieses Bindemotiv für GbsR wurde bereits bioinformatisch von Leyn *et al.* (2013) vorhergesagt. Genau dasselbe Bindemotiv konnte bioinformatisch vor CudC aus *S. xylosus* C2A und allen übrigen *Staphylococci* mit *gbsAB*-Operon entdeckt werden (4.3). Es konnte

zusätzlich anhand bioinformatischer Studien ein mögliches Bindemotiv des GbsR-Typ Regulators OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 identifiziert werden. Demnach bindet OpuAR vermutlich an diese Region auf dem opuAA-Promotor: -GTACAG-N₆-CTGTAC-. Dies konnte allerdings noch nicht eindeutig experimentell bestätigt werden (4.6.3). Da es sich allerdings ebenfalls um eine palindromische Sequenz handelt, liegt jedoch die Vermutung nahe. Die vorliegenden Bindemotive der GbsR-Typ Regulatoren mit osmotisch-abhängigen angrenzenden Operon weisen alle eine variable Länge der palindromischen Regionen auf. Zudem variiert die Anzahl der Basen im "Spacer" zwischen den palindromischen Regionen. Dies ist für MarR Regulatoren bereits mehrfach beobachtet worden. Bei dem Regulator MarR aus *E. coli* besteht je eine Hälfte des Palindroms aus fünf Basenpaaren. Dazwischen liegen lediglich zwei Basenpaare (Martin & Rosner, 1995). Der "Spacer" des Bindemotivs von OhrR aus *Xanthomoas campestris* zeigt das Gegenteil. Er beinhaltet sogar 17 Basenpaare. Das umliegende Palindrom mit dem OhrR in Interaktion ist dabei je 8 Basenpaare lang (Mongkolsuk *et al.*, 2002).

Besonders die Länge des Palindroms und die Anzahl der dazwischen liegenden Basenpaare scheinen bei der Bindung des GbsR-Typ Regulators entscheidend zu sein. Dies kann zumindest den Ergebnissen der *gbsA'-treA*-Reportergermutanten entnommen werden (4.2.1). Der Austausch von verschiedenen Basenpaaren im GbsR Bindemotiv hat nur an spezifischen Positionen eine starke Auswirkung.

Dass jedes Bindemotiv sehr spezifisch für seinen eigenen GbsR-Typ Regulator ist, zeigt das Experiment aus Kapitel 4.6.4. Hier wurde getestet, ob die drei GbsR-Typ Regulatoren aus *B. subtilis* die Regulation des putativen opuA-Operons aus dem marinen *B. infantis* NRRL B-14911 übernehmen können. Es stellte sich heraus, dass weder GbsR noch OpuCR oder OpuBR aus *B. subtilis* einen Effekt auf die Regulation des Operons aus dem marinen Bakterium haben. Demnach ist die Spezifität des Bindemotivs für OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 sehr groß. Dies könnte ebenfalls mit der variablen Länge, aber auch der unterschiedlichen Basensequenz der verschiedenen Bindemotive liegen.

Was allerdings auch sehr entscheidend ist, ist das Winged-Helix-Motiv eines jeden GbsR-Typ Regulators, mit dem der Regulator in direkte Interaktion mit der DNA tritt. Generell ist das Winged-Helix-Motiv unter den GbsR-Typ Regulatoren beider osmotisch-abhängigen Klassen vorhanden (4.3 & 4.5). In der Synthese-Klasse ist dies allerdings unter den einzelnen Regulatoren viel deutlicher konserviert (Abbildung 55; Anhang). Da aber auch ein nahezu identisches Bindemotiv vor den Genen *gbsA* aus *B. subtilis* und *cudA* aus *S. xylosus* C2A

gefunden wurden, ist dies nicht verwunderlich. Lediglich der “Spacer“ unterscheidet sich hier (4.3).

In der Transporter-Klasse ist das Winged-Helix-Motiv im Aminosäuresequenzvergleich nicht so deutlich innerhalb der ganzen Klasse konserviert (Abbildung 58; Anhang). Es sind lediglich einzelne Bereiche gleich. Innerhalb der OpuA-Untergruppe und der OpuB/OpuC-Untergruppe sind die Winged-Helix-Motive jeweils identischer zueinander. Die unterschiedlichen Aminosäuren scheinen die Spezifität eines jeden GbsR-Typ Regulators auszumachen. Das und die sich unterscheidenden Bindemotive auf der DNA jedenfalls würde erklären, warum OpuCR und OpuBR nicht die Regulation des *opuA*-Operons aus *B. infantis* NRRL B-14911 übernehmen können.

Dass die Aminosäuren, die bei der Bindung des Proteins an die DNA spezifisch sind, zeigten Mutationsstudien des MarR-Typ Regulators MepR aus *Staphylococcus aureus*. Birukou *et al.* (2014) schafften es für MepR die genaue Interaktion der Aminosäuren mit den Basenpaaren des Bindemotivs vor *mepR* anhand des Kristallstrukturkomplexes des Proteins mit der DNA aufzuklären. Dabei geht nach der Mutation von vier Aminosäuren, die in der vierten α -Helix des Proteins liegen, die Bindungsfähigkeit der DNA verloren. Diese vier mutierten Aminosäuren T⁶⁰, G⁶¹, P⁶² und T⁶³ gehen in der großen Furche der DNA eine Bindung mit vier Basen des palindromischen Bindemotivs ein.

Um eine Spezifität der Winged-Helix-Motive der GbsR-Typ Regulatoren zu ihren DNA Bindemotiven zu beweisen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Es könnte z.B. das bekannte Bindemotive von OpuCR aus *B. subtilis* gegen das von OpuAR in der Promotorregion vor *opuAA* aus *B. infantis* NRRL B-14911 ausgetauscht werden. Ob OpuCR nach dem Austausch die Regulation des putativen *opuA*-Operons übernehmen kann, könnte dann anhand einer *opuAA*-*treA*-Reporterfusion ermittelt werden. Andererseits ist es zudem möglich das Winged-Helix-Motiv der beiden Regulatoren OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 und OpuCR aus *B. subtilis* zu tauschen. Es würden demnach zwei Hybride erzeugt werden, die ebenfalls auf ihre Regulationsfähigkeiten hin in einer *opuAA*-*treA*-Reporterfusion überprüft werden könnten. Dafür wäre es allerdings notwendig die Stabilität der GbsR-Typ Regulatoren generell zu verbessern (4.8). Mit stabileren *in vitro* gereinigten GbsR-Typ Regulatoren, wäre es zudem möglich, die genauen Bindemotive der einzelnen Regulatoren nicht nur einzugrenzen, sondern auch eindeutig zu bestimmen. Dies müsste mit einem Footprint erfolgen. Anhand dessen, könnte auch aufgeklärt werden, warum in den bioinformatischen Analysen beobachtet wurde, dass über die ermittelten Palindrome hinaus, die umliegenden Bereiche hochkonserviert sind (4.2.2 & 4.3).

5.4 Ligandenbindung durch Kation- π Interaktion

5.4.1 Mögliche weitere Aminosäure der Ligandenbindetasche von GbsR-Typ Regulatoren entdeckt

Der Regulator GbsR aus *B. subtilis* reprimiert die Expression der beiden Operone *opuB* und *gbsAB* durch die Bindung an die DNA im Promotorbereich. Liegt Cholin in der Zelle vor, löst sich GbsR von der DNA und die Gene der beiden Operone können exprimiert werden (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Der genaue Mechanismus mit dem Cholin von GbsR-Typ Regulatoren gebunden wird, konnte von Henkel (2010) aufgeklärt werden. Dabei handelt es sich um den Mechanismus der Kation- π Interaktion. Die Kation- π Interaktion ist bereits bei mehreren Cholin-bindenden Proteinen beobachtet worden, die mit ihrem Liganden in Kristallstrukturen gelöst werden konnten. Dazu zählen die drei Substratbindeproteine verschiedener ABC-Transporter wie beispielsweise ChoX aus *Sinorhizobium meliloti* (Oswald *et al.*, 2008) und OpuBC und OpuCC aus *B. subtilis* (Du *et al.*, 2011; Pittelkow *et al.*, 2011). Bei einer Kation- π Interaktion tritt die positiv geladene Trimethylammonium-Kopfgruppe des Cholins in Wechselwirkung mit dem elektronegativ geladenen Oberflächenpotenzial der Aromaten (Dougherty, 1996). Sie formen eine sogenannte "aromatic cage" im Protein (Bremer, 2011). Bisher wurde angenommen, dass die aromatische Bindebox im GbsR aus *B. subtilis* von vier Phenylalaninen gebildet wird (Henkel, 2010; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Es wird allerdings vermutet, dass zwei weitere Phenylalanine (F⁹⁵ und F⁹⁸) in direkter Umgebung der Ligandenbindetasche ebenfalls an der Bindung des Liganden beteiligt sind. Um dies zu überprüfen wurden zwei weitere Mutanten des GbsR-Typ Regulators OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 auf die Bindungsaffinität mit Cholin überprüft. Die Mutanten wurden wie bereits die vorherigen Mutanten von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 analog zur Ligandenbindetasche des GbsRs aus *B. subtilis* verändert. An die entsprechenden Positionen im OpuAR (W⁹³ und N⁹⁶) wurden Phenylalanine eingefügt.

Wie erwartet, ist durch den Austausch zweier Aromaten, wie es bei dem Protein OpuAR W⁹³F der Fall ist, keine Veränderung der Bindeaffinität zu Cholin zu beobachten (4.7.1). Da sowohl mit Tryptophan als auch mit Phenylalanin eine Wechselwirkung durch einen Aromaten zum Liganden Cholin möglich ist (Dougherty, 1996), bleibt die Bindeaffinität gleich.

Entgegen der Erwartungen bleibt auch die Bindeaffinität zum Liganden der zweiten OpuAR Mutante (N⁹⁶F) gleich (4.7.1). Hier wurde die nicht aromatische Aminosäure Asparagin gegen den Aromaten Phenylalanin ausgetauscht. Da lediglich das Phenylalanin aufgrund seines elektronegativen Oberflächenpotentials in Wechselwirkung mit Cholin treten kann (Dougherty, 1996), wurde durch den Austausch eine deutlich stärkere Bindung erwartet.

Möglicherweise besitzt das N⁹⁶ in der Ligandenbindetasche des OpuAR-Wildtyps auch lediglich eine stabilisierende Funktion auf den Liganden Cholin. In der "aromatic cage" des Substratbindeproteins ChoX aus *S. meliloti*, ist dies beispielsweise der Fall. Hier wird die Ligandenbindetasche von insgesamt sieben Aminosäuren gebildet. Das Asparagin hat bei der Bindung von Cholin neben zwei Asparaginsäuren eine stabilisierende Funktion (Oswald *et al.*, 2008).

Für die Bindung von GbsR-Typ Regulatoren bedeutet dies, dass vermutlich auch die Aminosäuren an Position F⁹⁵ und F⁹⁸ (ausgehend von GbsR aus *B. subtilis*) an der Bindung des Liganden Cholin beteiligt sind. Die Aminosäure der Position 95 scheint dabei "aktiv" an der Kation- π Interaktion beteiligt. Die Aminosäure 98 übernimmt wahrscheinlich eine stabilisierende Funktion in der Ligandenbindebox. Ob diese beiden Aminosäuren allerdings tatsächlich an der Bindung des Liganden beteiligt sind, kann letztlich nur eine gelöste Kristallstruktur von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 zeigen.

5.4.2 Glycin Betain wird über Kation- π Interaktion von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 gebunden

Der GbsR-Typ Regulator OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 reguliert die Genexpression des putativen *opuA*-Operons, das für einen OpuA-Typ Transporter wie er aus *B. subtilis* bekannt ist, kodiert (4.6.3). Liegt Cholin, Glycin Betain oder Prolin Betain in der Zelle vor, wird dies von OpuAR gebunden (4.6.5). Der Regulator löst sich durch die Bindung des Liganden schließlich von der DNA und die Expression der Gene kann beginnen. Um herauszufinden, ob auch Glycin Betain über Kation- π Interaktion von OpuAR gebunden wird, wurde die Bindeaffinität des OpuAR-Wildtyps und aller OpuAR-Mutanten mit Glycin Betain bestimmt (4.7.1). Dabei wurde herausgefunden, dass das kompatible Solut Glycin Betain vom OpuAR-Wildtyp mit einer K_D von 301 μ M \pm 24 μ M etwas schlechter gebunden wird als Cholin. Die Bindung von Glycin Betain scheint dabei wie die des Cholins in derselben Ligandenbindetasche des OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 stattzufinden. Dies lässt sich aus den Bindeaffinitäten ableiten, die mit den OpuAR-Mutanten ermittelt wurden (4.7.1). Glycin Betain wird mit Ausnahme einer OpuAR-Mutante von allen gleich stark gebunden. Die Ausnahme bildet OpuAR R¹⁰⁰F. Hier bleibt die Bindeaffinität zu Glycin Betain genauso stark wie die des Wildtyps. Für Cholin konnte bei dieser Mutante eine deutlich verbesserte K_D im Vergleich zum Wildtyp-OpuAR ermittelt werden (Henkel, 2010). Die verbesserte Bindung zu Cholin ist damit zu erklären, dass durch den Austausch der nicht aromatischen Aminosäure in einen Aromaten (R zu F), eine weitere Aminosäure in Wechselwirkung mit Cholin treten kann

(Dougherty, 1996; Henkel, 2010). Dies scheint bei der Bindung von Glycin Betain in der Ligandenbindetasche dieser OpuAR-Mutante (R¹⁰⁰F) nicht der Fall zu sein. Wird im OpuAR allerdings zusätzlich zum Arginin¹⁰⁰ das Tyrosin⁹⁴ gegen ein Phenylalanin ausgetauscht, kann das Phenylalanin der OpuAR-Doppelmutante (Y⁹⁴F R¹⁰⁰F) die Bindung verstärken. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass bei der OpuAR-Doppelmutante die Ligandenbindetasche etwas größer ist und Glycin Betain besser hineinpasst. Es muss nämlich bedacht werden, dass die Aminosäure Tyrosin aufgrund der zusätzlichen Alkoholgruppe etwas größer ist, als die Aminosäure Phenylalanin. Demnach bietet die Bindetasche der Doppelmutante etwas mehr Raum, der scheinbar für die Bindung von Glycin Betain benötigt wird. Zudem gilt es zu beachten, dass auch Glycin Betain aufgrund der Carboxylgruppe etwas größer ist als Cholin. Cholin passt wahrscheinlich besser in die kleinere Tasche der OpuAR R¹⁰⁰F Mutante. Dass letztlich eine Aminosäure ausschlaggebend für die Spezifität einer Ligandenbindetasche sein kann, zeigen die Studien von Broy (2015). Hierbei konnte das Substratbindeprotein OpuBC des Cholin-spezifischen Transporters, nach dem Austausch einer einzigen Aminosäure (D⁷⁴T), neben Cholin ein großes Spektrum an kompatiblen Soluten in seiner "aromatic cage" binden. Diese biochemischen Daten wurden durch verschiedene Kristallstrukturen des mutierten OpuBC Proteins mit unterschiedlichen Liganden abgesichert (S. Smits, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; persönliche Mitteilung).

Auch Du *et al.* (2011) konnten durch den Austausch einer einzigen Aminosäure im Substratbindeprotein OpuCC aus *B. subtilis* in *in vitro* Studien am Fluoreszenzspektroskop ein verändertes Substratspektrum des Proteins nachweisen. Durch den Austausch der Aminosäure Threonin⁹⁴ in ein Asparagin kann die OpuCC-Mutante nur noch Cholin binden. Die drei kompatiblen Solute Glycin Betain, Carnitin und Ectoin werden nicht mehr gebunden. Du *et al.* (2011) diskutiert, dass dies durch die Carboxylgruppe des Asparagin in der "aromatic cage" der OpuCC-Mutante zustande kommt. Die negativen Ladungen der Carboxylgruppen des Asparagin und die der Liganden Glycin Betain, Carnitin und Ectoin stoßen sich dabei ab, sodass die Liganden nicht mehr in der Bindetasche gebunden werden können. Da Cholin keine Carboxygruppe besitzt, könne dies trotzdem gebunden werden (Du *et al.*, 2011).

Generell scheint die Spezifität der GbsR-Typ Ligandenbindetasche abhängig von der Zusammensetzung der Aminosäuren an den Positionen 95, 96, 98, 99, 102 und 103 (ausgehend von GbsR aus *B. subtilis*) zu sein. Die Synthese-Klasse beispielsweise zeigt an allen sechs Positionen fast ausschließlich Phenylalanine. Für zwei GbsR-Typ Regulatoren dieser Klasse konnte ermittelt werden, dass sie lediglich einen Liganden binden. Sowohl für GbsR aus *B. subtilis* (Nau-Wagner *et al.*, 2012), als auch für CudC aus *S. xylosus* C2A konnte

ausschließlich eine Bindung von Cholin nachgewiesen werden (4.4). Dies lässt vermuten, dass eine Ligandenbindetasche bestehend aus Phenylalaninen eine Spezifität für die Bindung von Cholin vermittelt. Es liegt die Vermutung nahe, dass alle GbsR-Typ Regulatoren der Synthese-Klassen ausschließlich Cholin binden. Nimmt man an, dass alle GbsR-Regulatoren dieser Klasse für die Regulation der angrenzenden *gbsAB*-Operon zuständig sind, wie es für GbsR aus *B. subtilis* gezeigt wurde (Nau-Wagner *et al.*, 2012), macht die ausschließliche Bindung von Cholin physiologisch durchaus Sinn. So werden die Glycin Betain Synthesegene lediglich exprimiert, wenn das Vorläufermolekül Cholin in der Zelle vorhanden ist.

Die GbsR-Typ Regulatoren der Transporter-Klasse sind vermutlich alle für die Regulation des angrenzenden ABC-Transporters zuständig, wie es für OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 (4.6.3) und OpuCR aus *B. subtilis* (Lee *et al.*, 2013) bereits gezeigt werden konnte. Dabei handelt es sich fast ausschließlich um die beiden Transportsysteme OpuA und OpuC mit einem weiten Spektrum für kompatible Solute wie sie aus *B. subtilis* bekannt sind. Dieses Ergebnis zeigt, dass es für die Organismen, die einen GbsR-Typ Regulator dieser Klasse besitzen, sinnvoll ist verschiedene kompatible Solute zu binden zu. Am Beispiel von OpuAR wurde dies gezeigt (4.6.5). Liegt eines der kompatiblen Solute in der Zelle vor, wird dies von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 gebunden und der Regulator löst sich von der DNA. Die Expression der Transportergene kann starten und mehr kompatible Solute können in die Zelle transportiert werden. Im Gegensatz zur Ligandenbindetasche der GbsR-Typ Regulatoren der Synthese-Klasse besteht die putative Ligandenbindetasche von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 nicht ausschließlich aus Phenylalaninen. Die Bindetasche der GbsR-Typ Regulatoren innerhalb der Transporter-Klasse variiert in der Zusammensetzung der Aminosäuren stark. (4.7.2). Besonders auffällig ist, dass neben den variierenden Aromaten auch viele nicht aromatische Aminosäuren auftauchen. Im Fall von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 sind das ein Asparagin⁹⁶ und ein Arginin¹⁰⁰. Hinsichtlich der Spezifität scheint eine vielfältige Aufstellung an Aminosäuren für die Ligandenbindebox der GbsR-Typ Regulatoren essentiell.

Trotz der Unterschiede der Aminosäuren in der Ligandenbindebox der GbsR-Typ Regulatoren der Transporter-Klasse sind besonders die beiden Phenylalanine an Aminosäureposition 97 und 101 (ausgehend von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911) hoch konserviert (4.7.2). Sie scheinen eine essentielle Rolle in allen Ligandenbindetaschen von GbsR-Typ Regulatoren, die osmotisch-abhängige Gene regulieren, einzunehmen. Neben diesen beiden Phenylalaninen wurde in den bioinformatischen Analysen beider Klassen ein weiteres Tryptophan in der Nähe des bisher analysierten möglichen "aromatic cage" entdeckt (4.7.2). Aufgrund der hohen

Konservierung ist anzunehmen, dass alle drei Aromaten eine essentielle Aufgabe bei der Bindung der Liganden in GbsR-Typ Regulatoren übernehmen. Vermutlich sind alle drei an der Kation- π Interaktion beteiligt. Um dies mit Sicherheit sagen zu können, sollten die entsprechenden Aminosäuren ebenfalls mutiert werden. Da es sich bei den GbsR-Typ Proteinen generell um sehr instabile Protein handelt, könnten die Mutationsstudien auch anhand von *treA*-Reportergenfusionen erfolgen. Dabei müssten die Mutationen im GbsR-Typ Regulator eingefügt werden, der in einem Stamm mit entsprechender *treA*-Fusion vorliegt. Die Ligandenbindebox von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 beispielsweise würde u.a. komplett analog der von GbsR aus *B. subtilis* verändert werden. Man würde in diesem Fall erwarten, dass nur noch Cholin als Induktor fungiert. Letztendlich kann aber nur eine gelöste Kristallstruktur mit Ligand Aufschluss darüber geben, welche Aminosäuren bei der Bindung der Liganden essentiell für die Spezifität oder die direkte Wechselwirkung sind.

Im Rahmen dieses Themas müsste zudem geklärt werden, ob auch OpuCR aus *B. subtilis* ein vielfältiges Spektrum an kompatiblen Soluten binden kann. Laut Lee *et al.* (2013) scheint OpuCR aus *B. subtilis* kein Cholin zu binden. Möglicherweise bindet der Regulator allerdings andere kompatible Solute. Zumindest ist dies die Vorhersage, die aus den bioinformatischen Daten der Bindetasche hervorgeht. Dies könnte anhand von fluoreszenzspektroskopischen Messungen mit gereinigtem OpuCR Protein aufgedeckt werden.

5.5 Osmoprotektion des marinen *B. infantis* NRRL B-14911

B. infantis NRRL B-14911 ist ein marines Bakterium, dass aus dem Golf von Mexiko isoliert wurde (Siefert *et al.*, 2000). Laut Alcaraz *et al.* (2008) besitzt *B. infantis* NRRL B-14911 eine partielle Auxotrophie für Prolin und Methionin. Wie sich im Rahmen dieser Arbeit herausstellte, scheinen dies nicht die einzigen Auxotrophien des Bakteriums zu sein (4.6.2). Möglicherweise besitzt *B. infantis* NRRL B-14911 auch keine Prolinauxotrophie. Dies kann anhand der Studien dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Sein naher Verwandter *B. megaterium* ist unter hochosmolaren Bedingungen in der Lage zur Osmoprotektion die kompatiblen Solute Glutamat und Prolin zu synthetisieren (Bursy *et al.*, 2007; Kuhlmann & Bremer, 2002; Siefert *et al.*, 2000). Demnach könnte auch *B. infantis* NRRL B-14911 selbst zu dieser Gruppe an *Bacilli* gehören, die Prolin selbst synthetisieren. Dies könnte mit Hilfe eines NMR-Spektrums von Zellextrakten überprüft werden.

Wie gezeigt werden konnte nutzt *B. infantis* NRRL B-14911 definitiv die kompatible Solute DMG, DMSP, Glycin Betain, HB und PB zur Osmoprotektion (4.6.2). Dabei scheinen die

beiden kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain die besten Osmoprotektiva für *B. infantis* NRRL B-14911 zu sein. Generell scheint das Bakterium nur diesen einen Transporter für kompatible Solute zu haben, da das Substratspektrum des OpuA-Transporters und das Spektrum der kompatiblen Solute, die als Osmoprotektiva von *B. infantis* NRRL B-14911 genutzt werden können, das gleiche ist (4.6.2). Da auch keine Protektion in Anwesenheit von Cholin herrscht, scheint *B. infantis* NRRL B-14911 entweder keine Transportsysteme wie OpuB oder OpuC aus *B. subtilis* für Cholin zu haben und/ oder zum keine Glycin Betain Synthesegene, die es zu Glycin Betain oxidieren. Anhand von mir durchgeführten bioinformatischen Analysen konnten keine weiteren vollständigen Gencluster anderer Transportsysteme für osmotische Schutzsubstanzen oder Glycin Betain Synthesegene, wie sie aus *B. subtilis* bekannt sind, im Genom von *B. infantis* NRRL B-14911 gefunden werden. Demnach scheinen alle kompatiblen Solute über OpuA in die Zelle transportiert zu werden.

5.5.1 Das *opu* Regulon in *B. infantis* NRRL B-14911

B. infantis NRRL B-14911 transportiert unter hochosmolaren Bedingungen kompatible Solute zur Osmoprotektion in die Zelle (4.6.2). Der Transport findet vermutlich nur über einen ABC-Transporter statt. Bei diesem handelt es sich um einen OpuA-Typ Transporter mit dem gleichen Aufnahmespektrum, wie es für den OpuA Transporter aus *B. subtilis* bekannt ist (4.6.1). Wahrscheinlich handelt es sich bei den kodierenden Genen, wie auch bei *opuA* aus *B. subtilis*, um ein Operon (Kempf & Bremer, 1995). Die Genexpression des *opuA*-Operons aus *B. infantis* NRRL B-14911 wird durch den GbsR-Typ Regulator OpuAR reguliert (4.6.2). Liegen keine kompatiblen Solute in der Zelle vor, bindet der Regulator vermutlich in der intergenen Region zwischen *opuAR* und *opuAA* (4.6.3). Durch die Bindung des Regulators an die DNA, die vermutlich auf dem hier detektierten SigA-Promotor von *opuAA* stattfindet (4.6.3), können die Gene des Operons nicht exprimiert werden. Eine solche Genregulation eines OpuA-Transportsystems ist bereits aus *L. lactis* bekannt. Dabei bindet der GntR-Typ Regulator BusR ebenfalls im Promotorbereich des *busA*-Operons und reprimiert so die Genexpression (Romeo *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu BusR aus *L. lactis* reagiert OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 nicht auf ionische Kräfte, sondern auf die drei Induktoren Cholin, Glycin Betain und Prolin Betain (4.6.5). Liegen die drei kompatiblen Solute in der Zelle vor, werden sie von OpuAR direkt gebunden (4.6.5). Der Repressor löst sich dann von der DNA im intergenen Bereich von *opuAR* und *opuAA*. Somit kann die Expression der Gene beginnen, wie im Modell der Regulation dargestellt ist (Abbildung 53). Es werden folglich mehr kompatible Solute durch

OpuA Transporter in die Zelle transportiert. Wie die erneute Repression des Systems stattfindet, ist unklar. Ein kompatibles Solut, dass wie im Fall von Glycin Betain bei GbsR aus *B. subtilis* einen reprimierenden Effekt auf das Regulon hat (Nau-Wagner *et al.*, 2012), konnte nicht gefunden werden. Möglicherweise spielt dabei die vorliegende Menge an kompatiblen Soluten eine wichtige Rolle. Bei dem *opuA*-Operon aus *B. subtilis* beispielweise, konnte beobachtet werden, dass eine steigende Konzentration von intrazellulärem Glycin Betain eine fallende *opuA*-Expression zur Folge hat (Hoffmann *et al.*, 2013).

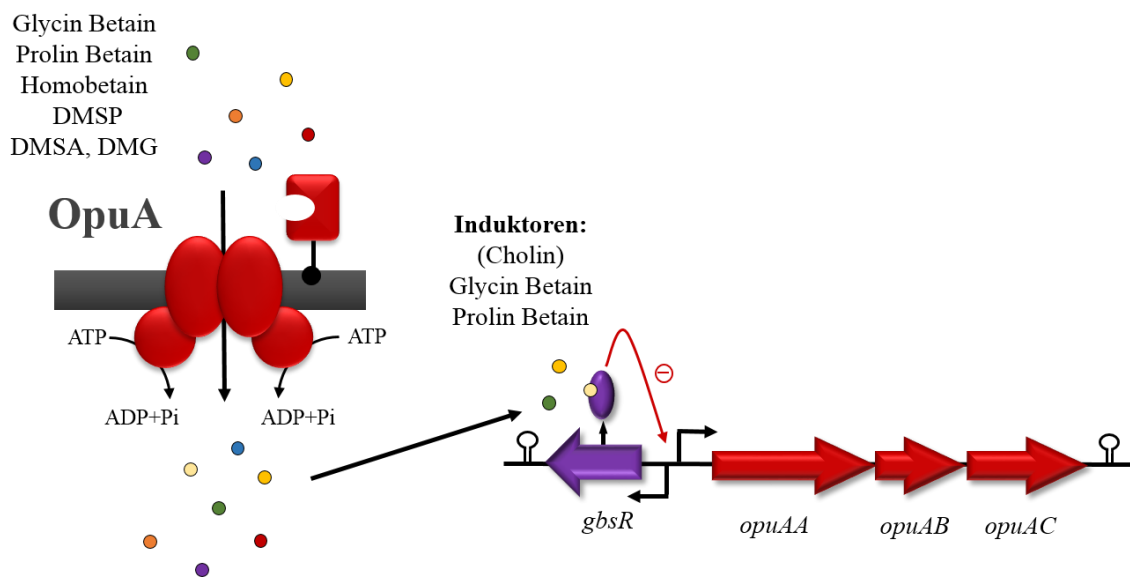


Abbildung 54: Modell zur Regulation der Genexpression des *opuA*-Operons aus *B. infantis* NRRL B-14911.

Liegen die drei Induktoren Cholin, Glycin Betain und Prolin Betain in der Zelle vor, binden diese an den GbsR-Typ Regulator. Durch die Bindung der kompatiblen Solute löst sich OpuAR von der DNA und weitere OpuA-Transporter können hergestellt werden. Wie das System wieder reprimiert wird ist bisher unklar.

Möglicherweise spielt auch die Osmolarität eine Rolle bei der Regulation. Allerdings ist das *opuA*-Operon aus *B. infantis* NRRL B-14911 nicht Salz-induziert (4.6.3), wie es für die *opuA* Gene aus *B. subtilis* bekannt ist (Kempf & Bremer, 1995). Die Genexpression in *B. subtilis* des *opuA*-Operons wird in Anwesenheit von Salz durch den Regulator RemA aktiviert (Winkelman *et al.*, 2013). Anhand von mir durchgeführter bioinformatische Analysen konnte herausgefunden werden, dass auch *B. infantis* NRRL B-14911 ein *remA* ähnliches Gen besitzt. Da das untersuchte *opuA*-Operon allerdings nicht Salz-induziert zu sein scheint, nimmt das RemA-Homolog vermutlich keinen Einfluss auf diese Gene zumindest nicht in derselben Art und Weise wie in *B. subtilis*.

Bedenkt man, dass Cholin nicht zum Substratspektrum des OpuA-Transporters in *B. infantis* NRRL B-14911 gehört, stellt sich die Frage, warum es dennoch als Induktor fungiert.

Möglicherweise ist dies ein zufälliger Befund, der lediglich in dem "Testsystem" *B. subtilis*, der mehrere Cholin-spezifische Transporter besitzt, gemacht wurde. Wie es scheint, besitzt *B. infantis* NRRL B-14911 neben OpuA keine weiteren Transportsysteme für osmotische Schutzsubstanzen (5.5). Demzufolge hat das Bakterium keine Möglichkeit, Cholin in die Zelle zu transportieren. Cholin fungiert demnach in *B. infantis* NRRL B-14911 selbst gar nicht als Induktor des Systems. Es ist also scheinbar irrelevant für die Zelle, dass der Regulator OpuAR *in vitro* Cholin binden kann. Ein ähnlicher Fall ist bereits bei dem Substratbindeprotein TmoX aus *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 bekannt (Li *et al.*, 2015). Hier ist das Substratbindeprotein des Trimethylamin N-Oxid-spezifischen (TMAO) ABC-Transporters TmoXWV in der Lage Cholin zu binden. Dass Cholin neben TMAO vom Substratbindeprotein gebunden werden kann, wurde hier in einer ITC-Messung (Isotherme Titrationskalorimetrie) bei der *in vitro* gereinigtes TmoX eingesetzt wurde, herausgefunden. Für *R. pomeroyi* DSS-3 scheint Cholin im Gegensatz zu TMAO keine weitere Relevanz als Stickstoffquelle darzustellen. Die Bindung von Cholin scheint daher vermutlich ein "Zufall" zu sein, der wahrscheinlich aufgrund der ähnlichen Strukturen zwischen Cholin und TMAO möglich ist (Li *et al.*, 2015). Da auch Glycin Betain und Cholin sich lediglich in einer Carboylgruppe in ihrer Struktur unterscheiden, liegt vielleicht auch bei der Bindung an OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 ein "Zufall" vor.

Dennoch ist unklar, warum lediglich die beiden kompatiblen Solute Glycin Betain und Prolin Betain Induktoren des Systems sind (4.6.5), wo der Transporter OpuA doch viel mehr kompatible Solute aufnehmen kann (4.6.1). Eine mögliche Erklärung dazu ist, dass dies die beiden besten Osmoprotektiva für das Bakterium *B. infantis* NRRL B-14911 sind. Wie in dem Protektionsassay gezeigt werden konnte, kann sich *B. infantis* NRRL B-14911 sowohl mit Glycin Betain als auch mit Prolin Betain am besten von osmotischem Stress schützen (4.6.2). Die Protektion durch die anderen kompatiblen Solute scheint so schlecht zu sein, dass es sich nicht lohnt, die Energie zu Herstellung eines Transporters aufzubringen.

Im Rahmen dieses Projektes gilt es zu klären, wie genau die Repression des *opuA*-Operons in *B. infantis* NRRL B-14911 eingeleitet wird. Dazu könnten der Einfluss von verschiedenen Glycin Betain Konzentrationen auf die Regulation des *opuA*-Operons getestet werden. Dies könnte mit den bereits bestehenden *opuAA'-treA*-Fusionen durchgeführt werden. Es könnte zudem der Einfluss von unterschiedlich hohen Salinitäten auf das System überprüft werden.

5.6 Stabilität *in vitro* gereinigter GbsR-Typ Regulatoren

GbsR-Typ Regulatoren scheinen *in vitro* nach der Reinigung zum größten Teil als aggregierte Proteine vorzuliegen. Das konnte zumindest für die drei verwendeten Regulatoren GbsR aus *B. subtilis*, OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911 und CudC aus *S. xylosus* C2A festgestellt werden (4.8.1). Eine leichte Verbesserung des Anteils an nicht aggregiertem Protein konnte nach der Produktion in dem *E. coli* ArcticExpress (DE3) RIL beobachtet werden. Dass die Produktionsweise allein aber nicht ausschlaggebend für den Anteil an aktiv gefaltetem Protein ist, zeigte die Produktion in *B. megaterium*, bei der ausschließlich Aggregate im Gelfiltrationslauf zu sehen sind (4.8.3). Auch der Tag über den das Protein gereinigt wurde, ist nicht der störende Faktor, der zur Aggregation des Proteins führt, wie in Kapitel 4.8.4 gezeigt werden konnte. Hier ist ebenfalls nach dem Gelfiltrationslauf des GbsR mit N-terminalem Maltosebindeprotein lediglich aggregiertes Proteins zu sehen (4.8.4). Es scheint außerdem die Position des Tags irrelevant für den Anteil an nicht aggregierten Protein zu sein.

Die einzige Komponente, die bisher konstant beibehalten wurde, ist der Puffer, in dem das Protein aufgenommen wurde. Alle GbsR-Typ Proteine wurden nach dem Zellaufschluss, während des Reinigungsprozess und auch im Gelfiltrationslauf in Tris-Puffer aufbewahrt. Dass dieser Puffer nicht bevorzugt für die Lagerung von GbsR-Typ Proteinen gewählt werden sollte, zeigte bereits Henkel (2010) in ihrer Bachelorarbeit. In dieser Studie wurde beobachtet, dass sich die gereinigten OpuAR-Mutanten wie auch das OpuAR-Wildtypproteine aus *B. infantis* NRRL B-14911 bereits nach einigen Tagen Lagerung einen deutlichen Proteinabbau aufweisen. Bei der Stabilität scheint außerdem die Temperatur der Proteine eine essentielle Rolle zu spielen. Dass ein Protein in drei verschiedenen Puffern unterschiedliche Aktivitäten aufweisen kann, zeigt Widderich *et al.* (2014). Die Hydroxylase EctD aus *Sphingopyxis alaskensis* zeigt dabei eine 15 %ig höhere Aktivität in TES-Puffer, als in Tris- und HEPES-Puffer bei gleichbleibendem pH-Wert. Auch diese Daten zeigen, dass es unbedingt notwendig ist, die GbsR-Typ Regulatoren vor der Reinigung in anderen Puffern aufzunehmen.

Um in Zukunft weitere Experimente mit *in vitro* gereinigten Proteinen vornehmen zu können und auch um die Kristallstruktur eines GbsR-Typ Regulators zu lösen, sollte diesem Vorhaben besonders hohe Priorität geschenkt werden.

5.7 Fazit

Die in dieser Arbeit charakterisierte Familie der GbsR-Typ Regulatoren scheint eine bedeutende Rolle bei der transkriptionellen Regulation von osmotisch-abhängigen Genen speziell in *Firmicutes* zu besitzen. GbsR-Typ Regulatoren scheinen dabei für die Regulation der Expression eines oder mehrere Operone zuständig zu sein, die für Transporter oder aber Synthesegene von osmotischen Schutzsubstanzen kodieren. Um eine physiologisch sinnvolle Expression eines Operons in der Zelle zu gewährleisten, scheint sogar eine Kreuzregulation von mehreren GbsR-Typ Regulatoren möglich zu sein, wie anhand eines vorgeschlagenen Regulationsmodells gezeigt werden konnte. Die osmotischen Schutzsubstanzen selbst nehmen als Induktoren des jeweiligen Regulons eine essentielle Rolle im Regulon ein, indem sie von dem entsprechenden Repressor über Kation- π Interaktion gebunden werden. Regulatoren der GbsR-Typ Familie scheinen demnach unter osmotischem Stress für die Zelle essentiell zu sein.

6. Literatur

Alcaraz, L.D., Olmedo, G., Bonilla, G., et al. (2008). The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 5803–5808.

Alekshun, M.N., & Levy, S.B. (1997). Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2067–2075.

Arnhold, C. (2011). Regulatorische und strukturelle Analyse des *Bacillus* sp. NRRL B-14911 ABC-Transporter OpuA. Masterarbeit. *Philipps-Universität Marburg*.

Atkinson, D.E. (1977). Cellular energy metabolism and its regulation New York: *Academic Press*.

Barg, H., Malten, M., Jahn, M., & Jahn, D. (2005). Protein and Vitamin Production in *Bacillus megaterium*. *Methods Biotechnol.* **18**, 205–223.

Bashir, A., Hoffmann, T., Smits, S.H.J., & Bremer, E. (2014a). Dimethylglycine Provides Salt and Temperature Stress Protection to *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2773–2785.

Bashir, A., Hoffmann, T., Kempf, B., Xie, X., Smits, S.H.J., & Bremer, E. (2014b). Plant-derived compatible solutes proline betaine and betonine confer enhanced osmotic and temperature stress tolerance to *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **160**, 2283–2294.

Birukou, I., Seo, S.M., Schindler, B.D., Kaatz, G.W., & Brennan, R.G. (2014). Structural mechanism of transcription regulation of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux operon *mepRA* by the MarR family repressor MepR. *Nucleic Acids Res.* **42**, 2774–2788.

Blair, K.M., Turner, L., Winkelman, J.T., Berg, H.C., & Kearns, D.B. (2008). A Molecular Clutch Disables Flagella in the *Bacillus subtilis* Biofilm. *Science* (80-.). **320**, 1636–1638.

Von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, R.M., & Bremer, E. (1997). Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol. Microbiol.* **25**, 175–187.

Boch, J., Boch, J., Kempf, B., Kempf, B., Schmid, R., Schmid, R., Bremer, E., Bremer, E., Dna, T., & Dna, T. (1996). Synthesis of the Osmoprotectant Glycine Betaine in *Bacillus subtilis*: Characterization of the *gbsAB* Genes. *Microbiology* **178**, 5121–5129.

Boch, J., Nau-Wagner, G., Kneip, S., & Bremer, E. (1997). Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: Characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch. Microbiol.* **168**, 282–289.

Booth, I.R., Edwards, M.D., Black, S., Schumann, U., & Miller, S. (2007). Mechanosensitive channels in *bacteria*: signs of closure? *Nat Rev Microbiol* **5**, 431–440.

- Bremer, E.** (2001). Adaptation to changing osmolarity. In "*Bacillus Subtilis* and Its Closest Relatives: From Genes to Cells", Eds.: A.L. Sonnenshein, R.M. Losick, & J.A. Hoch. Washington, DC, USA: *ASM Press*, pp. 385–391.
- Bremer, E.** (2011). Crystal ball - 2011. *Environ. Microbiol. Rep.* **3**, 1–26.
- Bremer, E., & Krämer, R.** (2000). Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in *bacteria*. In "Bacterial Stress Response", Eds.: G. Storz, & R. Hengge-Aronis. Washington, DC, USA: *ASM Press*, pp. 79–97.
- Broy, S.** (2015). Das marine Dimethylpropionat als protektives Osmolyt und die Evolution verwandter ABC Transporter für die Aufnahme von kompatiblen Soluten. Dissertation. *Philipps-Universität Marburg*.
- Broy, S., Chen, C., Hoffmann, T., Brock, N.L., Nau-Wagner, G., Jebbar, M., Smits, S.H.J., Dickschat, J.S., & Bremer, E.** (2015). Abiotic stress protection by ecologically abundant dimethylsulfoniopropionate and its natural and synthetic derivatives: insights from *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol.* **17**, n/a – n/a.
- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., et al.** (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Science* (80-.). **273**, 1058–1073.
- Burkhardt, J., Sewald, X., Bauer, B., Saum, S.H., & Müller, V.** (2009). Synthesis of glycine betaine from choline in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: Co-regulation of two divergent, polycistronic operons. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**, 38–43.
- Bursy, J., Pierik, a. J., Pica, N., & Bremer, E.** (2007). Osmotically Induced Synthesis of the Compatible Solute Hydroxyectoine Is Mediated by an Evolutionarily Conserved Ectoine Hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **282**, 31147–31155.
- Da Costa, M.S., Santos, H., & Galinski, E.A.** (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**, 117–153.
- Csonka, L.N.** (1989). Physiological and genetic responses of *bacteria* to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**, 121–147.
- Csonka, L.N., & Handson, A.D.** (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol* **45**, 569–606.
- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., & Goloubinoff, P.** (2001). Chemical Chaperones Regulate Molecular Chaperones in Vitro and in Cells under Combined Salt and Heat Stresses. *J. Biol. Chem.* **276**, 39586–39591.
- Doige, C. a, & Ames, G.F.** (1993). HUMANS : Relevance to Cystic Fibrosis and Multidrug Resistance.
- Dougherty, D.A.** (1996). Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* **271**, 163–168.

- Du, Y., Shi, W.-W., He, Y.-X., Yang, Y.-H., Zhou, C.-Z., & Chen, Y.** (2011). Structures of the substrate-binding protein provide insights into the multiple compatible solute binding specificities of the *Bacillus subtilis* ABC transporter OpuC. *Biochem. J.* **436**, 283–289.
- Earl, A.M., Losick, R., Kolter, R., Wang, J., Dye, B.T., Rajashankar, K.R., Kurinov, I., & Brenda, A.** (2010). NIH Public Access. **16**, 1–11.
- Gajiwala, K.S., & Burley, S.K.** (2000). Winged helix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 110–116.
- Galinski, E.A.** (1993). Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interactions, stress protection. *Experientia* **49**, 487–496.
- Galinski, E.A., & Trüper, H.G.** (1994). Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 95–108.
- Gamer, M., Fröde, D., Biedendieck, R., Stammen, S., & Jahn, D.** (2009). A T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Bacillus megaterium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 1195–1203.
- González, J.M., Mayer, F., Moran, M.A., Hodson, R.E., & Whitman, W.B.** (1997). *Microbulbifer hydrolyticus* gen. nov., sp. nov., and *Marinobacterium georgiense* gen. nov., sp. nov., two marine bacteria from a lignin-rich pulp mill waste enrichment community. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 369–376.
- Gotsche, S., & Dahl, M.K.** (1995). Purification and characterization of the phospho-alpha(1,1)glucosidase (TreA) of *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* **177**, 2721–2726.
- Gu, Z.J., Wang, L., Le Rudulier, D., Zhang, B., & Yang, S.S.** (2008). Characterization of the glycine betaine biosynthetic genes in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8T. *Curr. Microbiol.* **57**, 306–311.
- Haldenwang, W.G.** (1995). The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* **59**, 1–30.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580.
- Hartig, E., & Jahn, D.** (2012). Regulation of the Anaerobic Metabolism in *Bacillus subtilis*. *Adv. Microb. Physiol.* **61**, 195–216.
- Harwood, C.R., & Cutting, S.M.** (1990). Molecular biological methods for *Bacillus* (Chichester: John Wiley and Sons).
- Hecker, M., Schumann, W., & Völker, U.** (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**, 417–428.
- Henkel, S.** (2010). Charakterisierung des Regulatorproteins OpuAR und des ABC-Transporters OpuA aus dem marinen *Bacillus* sp. NRRL B-14911. Bachelorarbeit. Philipps-Universität Marburg.

- Higgins, C.F.** (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 67–113.
- Hirooka, K., Kunikane, S., Matsuoka, H., Yoshida, K.-I., Kumamoto, K., Tojo, S., & Fujita, Y.** (2007). Dual Regulation of the *Bacillus subtilis* Regulon Comprising the *lmrAB* and *yxaGH* Operons and *yxaF* Gene by Two Transcriptional Repressors, LmrA and YxaF, in Response to Flavonoids. *J. Bacteriol.* **189**, 5170–5182.
- Hoffmann, T., & Bremer, E.** (2011). Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition. *J. Bacteriol.* **193**, 1552–1562.
- Hoffmann, T., Boiangiu, C., Moses, S., & Bremer, E.** (2008). Responses of *Bacillus subtilis* to hypotonic challenges: Physiological contributions of mechanosensitive channels to cellular survival. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2454–2460.
- Hoffmann, T., Wensing, A., Brosius, M., Steil, L., Völker, U., & Bremer, E.** (2013). Osmotic control of *opuA* expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools. *J. Bacteriol.* **195**, 510–522.
- Holtmann, G., & Bremer, E.** (2004). Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: Involvement of Opu transporters. *Society* **186**, 1683–1693.
- Holtmann, G., Bakker, E.P., Uozumi, N., & Bremer, E.** (2003). KtrAB and KtrCD: Two K⁺ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J. Bacteriol.* **185**, 1289–1298.
- Horn, C., Bremer, E., & Schmitt, L.** (2005). Functional overexpression and in vitro re-association of OpuA, an osmotically regulated ABC-transport complex from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* **579**, 5765–5768.
- Jebbar, M., Von Blohn, C., & Bremer, E.** (1997). Ectoine functions as an osmoprotectant in *Bacillus subtilis* and is accumulated via the ABC-transport system OpuC. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**, 325–330.
- Kappes, R.M., & Bremer, E.** (1998). Response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity: Uptake of carnitine, crotonobetaine and γ -butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. *Microbiology* **144**, 83–90.
- Kappes, R.M., & Kempf, B.** (1996). Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J. Bacteriol.* **178**, 5071–5079.
- Kappes, R.M., Kempf, B., Kneip, S., Boch, J., Gade, J., Meier-Wagner, J., & Bremer, E.** (1999). Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **32**, 203–216.
- Kempf, B., & Bremer, E.** (1995). OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 16701–16713.

- Kempf, B., & Bremer, E.** (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* **170**, 310–330.
- Kempf, B., Gade, J., & Bremer, E.** (1997). Lipoprotein from the osmoregulated ABC transport system OpuA of *Bacillus subtilis*: Purification of the glycine betaine binding protein and characterization of a functional lipidless mutant. *J. Bacteriol.* **179**, 6213–6220.
- Kimura, Y., Kawasaki, S., Yoshimoto, H., & Takegawa, K.** (2010). Glycine betaine biosynthesized from glycine provides an osmolyte for cell growth and spore germination during osmotic stress in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **192**, 1467–1470.
- Knapp, S., Ladenstein, R., & Galinski, E.A.** (1999). Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betain. *Extremophiles* **3**, 191–198.
- Krispin, O., & Allmansberger, R.** (1995). Chances in DNA supertwist as a response of *Bacillus subtilis* towards different kinds of stress. *FEMS Microbiol* **134**, 129–135.
- Krulwich, T. A.** (2001). The Na⁺ -dependence of alkaliphily in *Bacillus*. *Science* (80-.). **1505**, 158–168.
- Kuhlmann, A.U., & Bremer, E.** (2002). Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 772–783.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., et al.** (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249–256.
- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M.W., Falkenberg, P., McDougall, J., & Strøm, A.R.** (1991). DNA sequence and analysis of the bet genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **5**, 1049–1064.
- Lee, C.H., Wu, T.Y., & Shaw, G.C.** (2013). Involvement of OpcR, a GbsR-type transcriptional regulator, in negative regulation of two evolutionarily closely related choline uptake genes in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. (United Kingdom)* **159**, 2087–2096.
- Leyn, S. a., Kazanov, M.D., Sernova, N. V., Ermakova, E.O., Novichkov, P.S., & Rodionova, D. A.** (2013). Genomic reconstruction of the transcriptional regulatory network in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **195**, 2463–2473.
- Li, C., Chen, X., Shao, X., Wei, T., Wang, P., Xie, B., Qin, Q., & Zhang, X.** (2015). Mechanistic Insight into Trimethylamine N -Oxide Recognition by the Marine Bacterium *Ruegeria pomeroyi* DSS-3. **197**, 3378–3387.
- Lucht, J.M., & Bremer, E.** (1994). Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transporter system ProU. *FEMS Microbiol* **14**, 3–20.
- Ma, J.C., & Dougherty, D.A.** (1997). The Cation- π Interaction. *Chem Rev* **97**, 1303–1324.

- Martin, R.G., & Rosner, J.L.** (1995). Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5456–5460.
- Miller, J.H.** (1972). Experiments in molecular genetics. New York: *Cold Spring Harbor*.
- Miller, J.H.** (1992). A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related *bacteria*. New York: *Cold Spring Harbor laboratory Press*.
- Mongkolsuk, S., Panmanee, W., Atichartpongkul, S., Vattanaviboon, P., Whangsuk, W., Fuangthong, M., Eiamphungporn, W., Sukchawalit, R., & Utamapongchai, S.** (2002). The repressor for an organic peroxide-inducible operon is uniquely regulated at multiple levels. *Mol. Microbiol.* **44**, 793–802.
- Nau-wagner, G., Boch, J., Good, J.A. Le, Good, J. a N.N.L.E., & Bremer, E.** (1999). High-Affinity Transport of Choline- O -Sulfate and Its Use as a Compatible Solute in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 560–568.
- Nau-Wagner, G., Oppper, D., Rolbetzki, A., Boch, J., Kempf, B., Hoffmann, T., & Bremer, E.** (2012). Genetic control of osmoadaptive glycine betaine synthesis in *Bacillus subtilis* through the choline-sensing and glycine betaine-responsive GbsR repressor. *J. Bacteriol.* **194**, 2703–2714.
- Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., Smirnova, T., Grigoriev, I. V., & Dubchak, I.** (2014). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Res.* **42**, 26–31.
- Nyyssölä, A., Kerovuoto, J., Kaukinen, P., Von Weymarn, N., & Reinikainen, T.** (2000). Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *J. Biol. Chem.* **275**, 22196–22201.
- Oppper** (2009). GbsR: Ein neuer transkriptioneller Repressor in *Bacillus subtilis* zur Regulation des Cholin zu Glycin Betain Synthesewegs. Dissertation. *Philipps-Universität Marburg*.
- Oswald, C., Smits, S.H.J., Höing, M., Sohn-Bösser, L., Dupont, L., Le Rudulier, D., Schmitt, L., & Bremer, E.** (2008). Crystal structures of the choline/acetylcholine substrate-binding protein ChoX from *Sinorhizobium meliloti* in the liganded and unliganded-closed states. *J. Biol. Chem.* **283**, 32848–32859.
- Pittelkow, M., Tschapek, B., Smits, S.H.J., Schmitt, L., & Bremer, E.** (2011). The crystal structure of the substrate-binding protein OpuBC from *Bacillus subtilis* in complex with choline. *J. Mol. Biol.* **411**, 53–67.
- Poolmann, B., & Glaesker, E.** (1998). Regulation of compatible solute accumulation in *bacteria*. *Mol Microbiol.* **29**, 397–407.
- Ray, S.S., Bonanno, J.B., Chen, H., de Lencastre, H., Wu, S., Tomasz, A., & Burley, S.K.** (2003). X-ray structure of an *M. jannaschii* DNA-binding protein: implications for antibiotic resistance in *S. aureus*. *Proteins* **50**, 170–173.

- Roberts, M.F.** (2005). Microorganisms. *Saline Systems* **30**, 1–30.
- Roesser, M., & Mueller, V.** (2001). Osmoadaptation in *bacteria* and *archaea*: common principles and differences. *Env. Microbiol* **3**, 743–754.
- Romeo, Y., Obis, D., Bouvier, J., Guillot, A., Fourçans, A., Bouvier, I., Gutierrez, C., & Mistou, M.Y.** (2003). Osmoregulation in *Lactococcus lactis*: BusR, a transcriptional repressor of the glycine betaine uptake system BusA. *Mol. Microbiol.* **47**, 1135–1147.
- Romeo, Y., Bouvier, J., & Gutierrez, C.** (2007). Osmotic regulation of transcription in *Lactococcus lactis*: Ionic strength-dependent binding of the BusR repressor to the *busA* promoter. *FEBS Lett.* **581**, 3387–3390.
- Rosenstein, R., Futter-bryniok, D., & Götz, F.** (1999). The Choline-Converting Pathway in *Staphylococcus xylosus* C2A : Genetic and Physiological Characterization. *J. Bacteriol.* **181**, 2273–2278.
- Sambrook, J., & Russell, D.W.** (2001). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press.
- Schöck, F., Gotsche, S., & Dahl, M.K.** (1996). Vectors using the phospho-0 -(1,1)-glucosidase-encoding gene. **170**, 77–80.
- Schumann, O.** (2015). Identifizierung der Bindestelle des Regulators GbsR vor dem gbsAB Operon in *Bacillus subtilis*. Bachelorarbeit. Philipps-Universität Marburg.
- Shikuma, N.J., Davis, K.R., Fong, J.N.C., & Yildiz, F.H.** (2013). The transcriptional regulator, CosR, controls compatible solute biosynthesis and transport, motility and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Environ. Microbiol.* **15**, 1387–1399.
- Siefert, J.L., Larios-Sanz, M., Nakamura, L.K., Slepecky, R.A., Paul, J.H., Moore, E.R., Fox, G.E., & Jurtshuk, P.J.** (2000). Phylogeny of the marine *Bacillus* isolate from the Gulf of Mexico. *Curr. Microbiol.* **41**, 84–88.
- Smits, S.H.J., Höing, M., Lecher, J., Jebbar, M., Schmitt, L., & Bremer, E.** (2008). The compatible-solute-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis*: Ligand binding, site-directed mutagenesis, and crystallographic studies. *J. Bacteriol.* **190**, 5663–5671.
- Spiegelhalter, F., & Bremer, E.** (1998). Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis*: Contributions of the sigma A- and sigma B-dependent stress-responsive promoters. *Mol. Microbiol.* **29**, 285–296.
- Spizizen, J.** (1958). Transformation of Biochemically Deficient Strains of *Bacillus Subtilis* By Deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **44**, 1072–1078.
- Street, T.O., Bolen, D.W., & Rose, G.D.** (2006). A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 13997–14002.
- Takamatsu, H., & Watabe, K.** (2002). Assembly and genetics of spore protective structures. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 434–444.

- Ventosa, a, Nieto, J.J., & Oren, A.** (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 504–544.
- Waditee, R., Bhuiyan, M.N.H., Rai, V., Aoki, K., Tanaka, Y., Hibino, T., Suzuki, S., Takano, J., Jagendorf, A.T., Takabe, T., & Takabe, T.** (2005). Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 1318–1323.
- Widderich, N., Höppner, A., Pittelkow, M., Heider, J., Smits, S.H.J., & Bremer, E.** (2014). Biochemical Properties of Ectoine Hydroxylases from Extremophiles and Their Wider Taxonomic Distribution among Microorganisms. *PLoS One* **9**, e93809.
- Wilkinson, S.P., & Grove, A.** (2006). Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Curr. Issues Mol. Biol.* **8**, 51–62.
- Winkelman, J.T., Blair, K.M., & Kearns, D.B.** (2009). RemA (YlxA) and RemB (YaaB) regulate extracellular matrix operon expression and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **191**, 3981–3991.
- Winkelman, J.T., Bree, A.C., Bate, A.R., Eichenberger, P., Gourse, R.L., & Kearns, D.B.** (2013). RemA is a DNA-binding protein that activates biofilm matrix gene expression in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **88**, 984–997.
- Wood, J.M.** (1999). Osmosensing by *Bacteria*: Signals and Membrane-Based Sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 230–262.
- Wood, J.M., Bremer, E., Csonka, L.N., Kraemer, R., Poolman, B., van der Heide, T., & Smith, L.T.** (2001). Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *CBP Part A* **130**, 437–460.
- Yancey, P.H.** (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* **208**, 2819–2830.
- Ziegler, Y.** (2009). Die Rolle von Glycin Betain im marinen *Bacillus sp.* NRRL B-14911. Bachelorarbeit. *Philipps-Universität Marburg*.
- Ziegler, C., Bremer, E., & Krämer, R.** (2010). The BCCT family of carriers: From physiology to crystal structure. *Mol. Microbiol.* **78**, 13–34.

7. Anhang

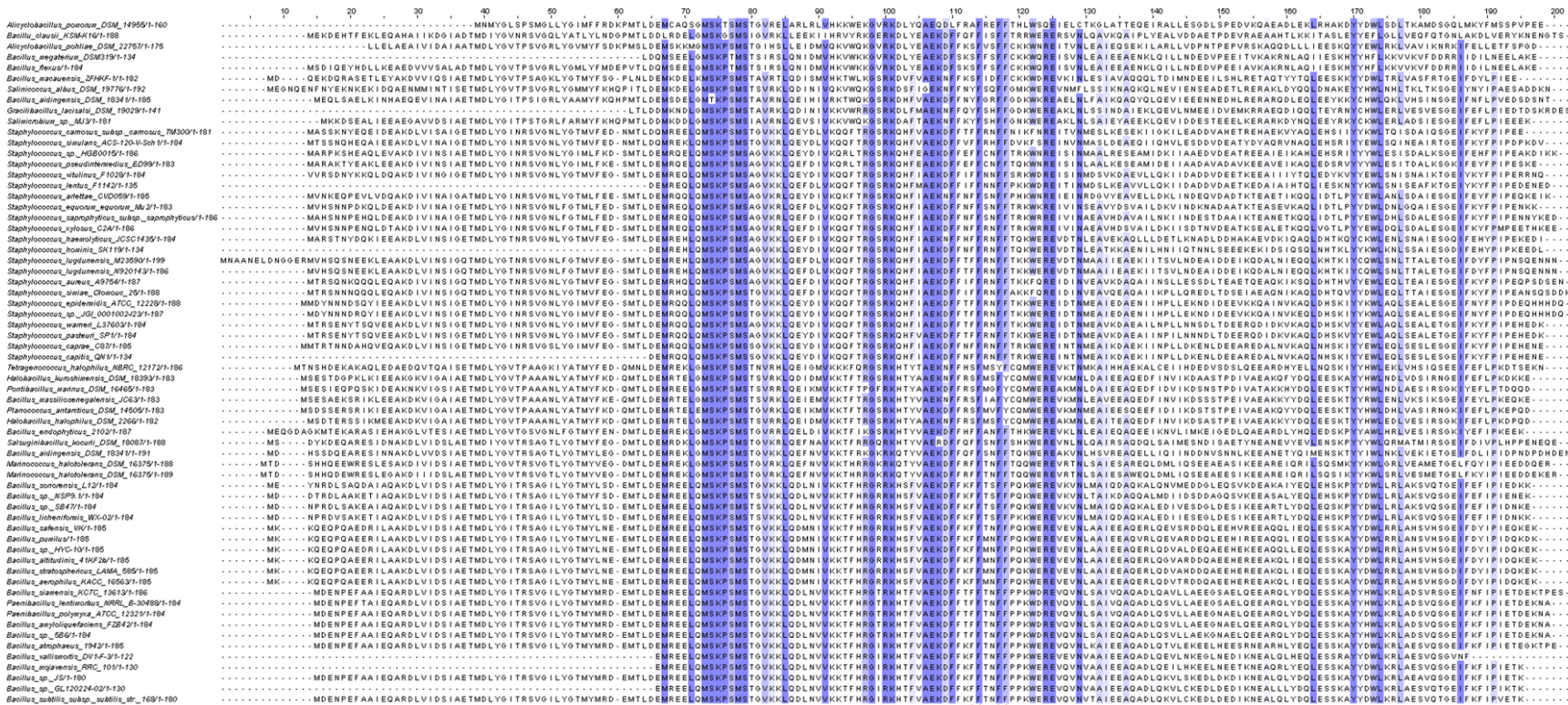


Abbildung 55: Sequenzvergleich von GbsR-Typ Regulatoren der Synthese Klasse.

Dargestellt ist ein Aminosäuresequenzvergleich von 66 GbsRs aus der Synthese-Klasse, die ein direkt angrenzendes und vollständiges *gbsAB*-Operon auf dem Genom aufweisen. Eingezeichnet ist das Winged-Helix-Motiv von GbsR aus *B. subtilis*, das von Nau-Wagner *et al.* (2012) festgelegt wurde. Außerdem sind die aromatischen Aminosäuren, die an der Bindung des Liganden Cholins beteiligt sind, eingezeichnet.



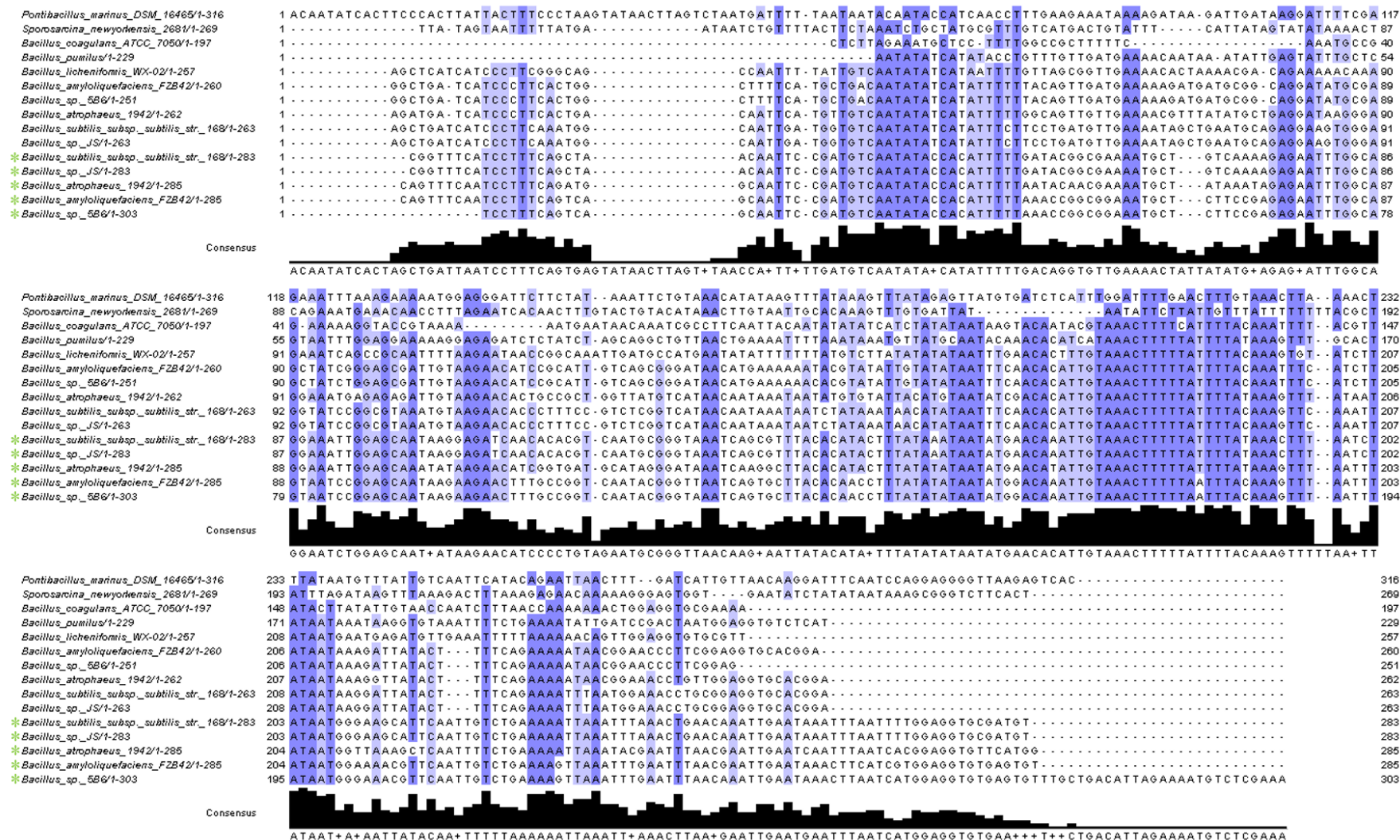


Abbildung 57: Übersicht des Sequenzvergleichs der kompletten Promotorregion vor den jeweiligen *opuBA*- (*) und *opuCA*-Genen der OpuB/OpuC-Untergruppe.

Eine besonders hoch konservierte Region liegt im mittleren Bereich der Promotorregionen.

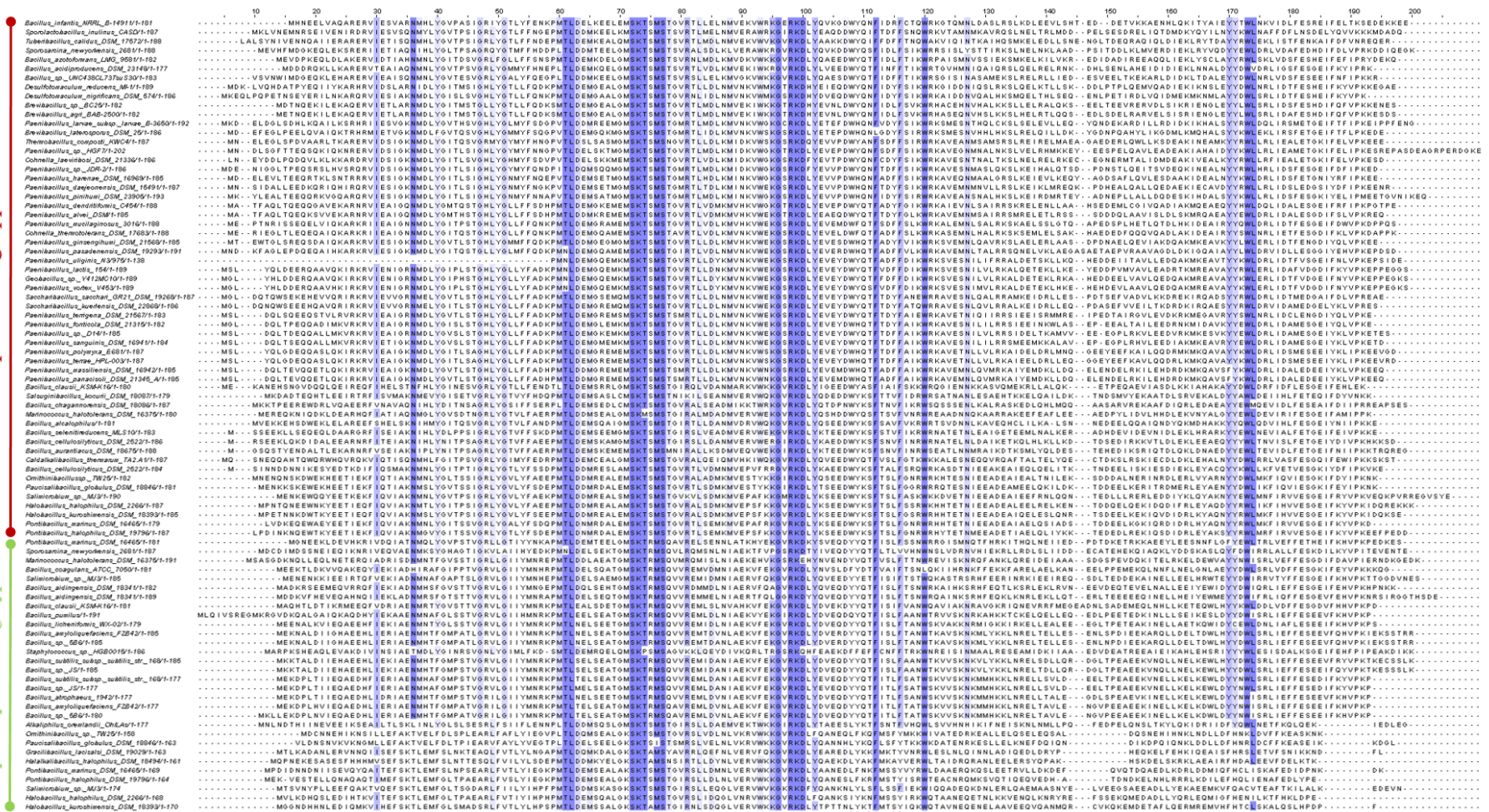


Abbildung 58: Sequenzvergleich aller GbsR-Typ Regulator der Transporter-Klasse.

Dargestellt ist ein Aminosäuresequenzvergleich von allen GbsR-Typ Regulatorn der Transporter-Klasse. Eingetragen ist das Winged-Helix-Motiv von OpuCR aus *B. subtilis*, das von Lee et al. (2013) festgelegt wurde. Außerdem sind die teils aromatischen Aminosäuren von OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911, die an der Bindung des Liganden beteiligt sind, eingezeichnet.

Abbildung 59: Sequenzvergleich der kompletten Promotorregion vor *opuAA* aus der OpuA-Untergruppe (Teil 1).

Der größte konservierte Bereich liegt in der Mitte der Promotorregionen.



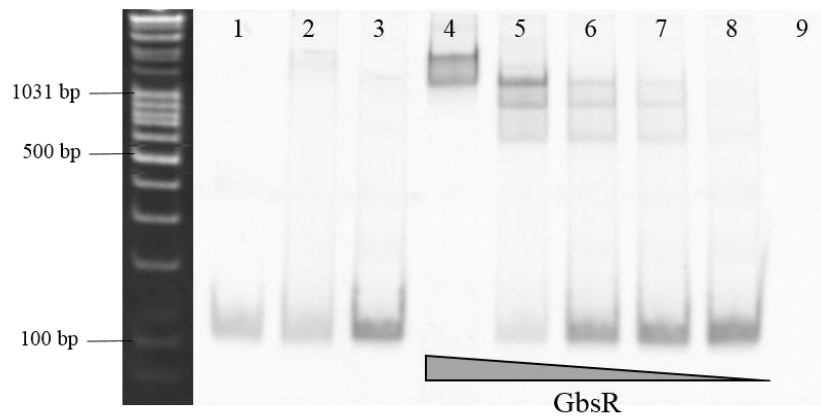


Abbildung 61: EMSA der *gbsA*-Promotorregion und *in vitro* gereinigtem GbsR aus *B. subtilis*.

(1) Kontrollfragment *gbsA* ohne GbsR, (2) Kontrollfragment *gbsA* (98 bp) mit 1 µg GbsR, (3) PCR Fragment mit intergener Region (96 bp vor *gbsA*) ohne GbsR, (4-8) PCR Fragment mit intergener Region (96 bp vor *gbsA*) mit abfallender Konzentration von GbsR (1 µg, 0,5 µg, 0,2 µg, 0,1 µg und 0,01 µg), (9) Negativkontrolle Mastermix. GbsR scheint an der DNA vor *gbsA* binden zu können. Die Ergebnisse dieses EMSA sind dennoch höchst kritisch zu betrachten, da der größte Anteil an eingesetztem Protein aggregiert vorliegt.

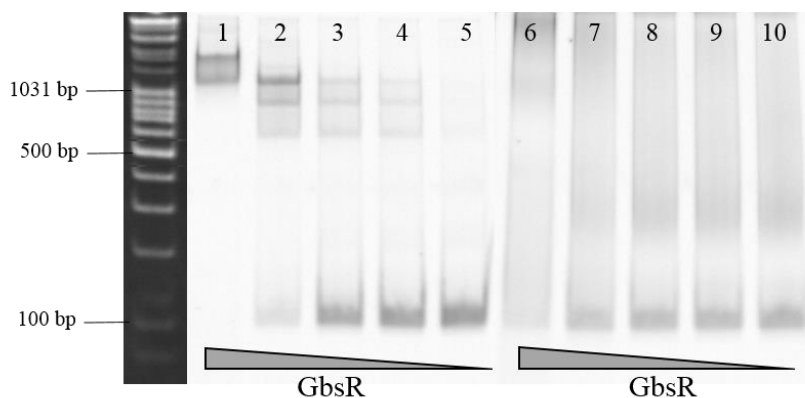


Abbildung 62: EMSA mit *in vitro* gereinigtem GbsR aus *B. subtilis* und der *gbsA*-Promotorregion mit und ohne Bindemotiv aus *B. subtilis*.

(1-5) PCR Fragment intergene Region (96 bp vor *gbsA*) mit abfallender GbsR Konzentration (1 µg, 0,5 µg, 0,2 µg, 0,1 µg und 0,01 µg). (6-10) PCR Fragment mit intergener Region (96 bp vor *gbsA*) ohne putatives Bindemotiv (Deletion der Basenpaare TTAAATTTTATTAA) mit abfallenden Konzentrationen von GbsR (1 µg, 0,5 µg, 0,2 µg, 0,1 µg und 0,01 µg). GbsR scheint nicht mehr an der DNA vor *gbsA* binden zu können, wenn das Bindemotiv vor *gbsA* vorliegt. Die Ergebnisse dieses EMSA sind dennoch höchst kritisch zu betrachten, da der größte Anteil an eingesetztem Protein aggregiert vorliegt.

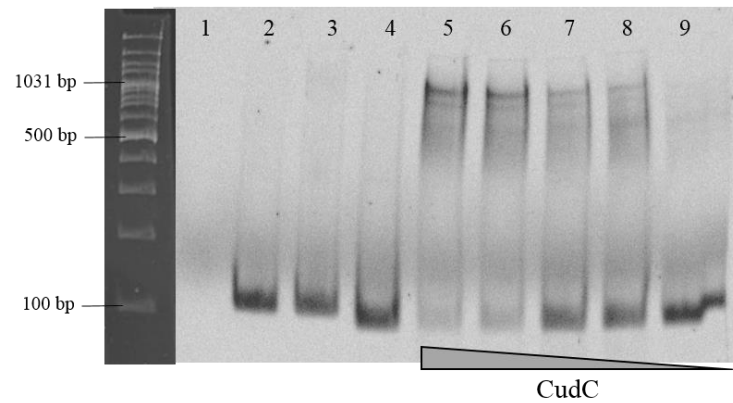


Abbildung 63: EMSA der *cudA*-Promotorregion und *in vitro* gereinigtem CudC aus *S. xylosus* C2A.

(1) Mastermix, (2) Kontrollfragment *cudA* (107 bp) ohne CudC, (3) Kontrollfragment *cudA* mit 4 µg CudC, (4) PCR Fragment mit intergener Region (94 bp vor *cudA*) ohne CudC, (5-9) PCR Fragment mit intergener Region (94 bp vor *cudA*) mit abfallender Konzentration von CudC (4 µg, 3 µg, 2 µg, 1 µg und 0,2 µg). CudC scheint an der DNA vor *cudA* binden zu können. Die Ergebnisse dieses EMSA sind dennoch höchst kritisch zu betrachten, da der größte Anteil an eingesetztem Protein aggregiert vorliegt.

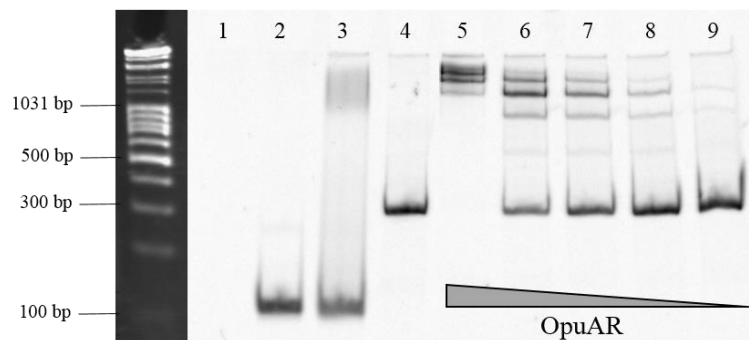


Abbildung 64: EMSA der *opuAA*-Promotorregion und *in vitro* gereinigtem OpuAR aus *B. infantis* NRRL B-14911.

(1) Mastermix, (2) Kontrollfragment *opuAA* (105 bp) ohne OpuAR, (3) Kontrollfragment *opuAA* mit 3 µg OpuAR, (4) PCR Fragment mit kompletter intergener Region (301 bp) von *opuAR* und *opuAA* ohne OpuAR, (5-9) PCR Fragment mit kompletter intergener Region von *opuAR* und *opuAA* mit abfallender Konzentration von OpuAR (3 µg, 2 µg, 1 µg, 0,15 µg und 0,015 µg). OpuAR scheint an der DNA vor *opuAA* binden zu können. Die Ergebnisse dieses EMSA sind dennoch höchst kritisch zu betrachten, da der größte Anteil an eingesetztem Protein aggregiert vorliegt.

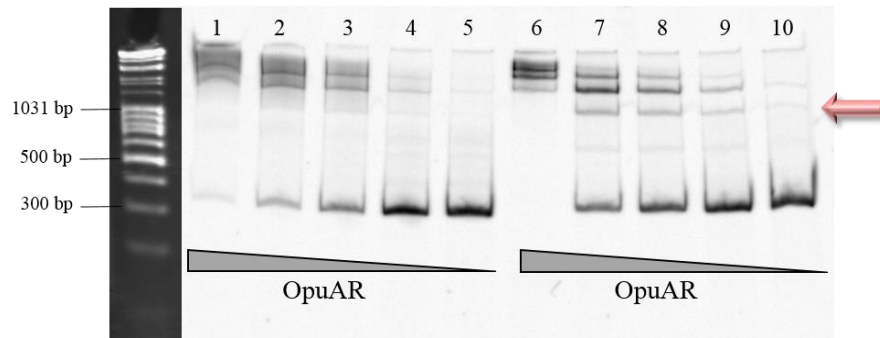


Abbildung 65: EMSA mit *in vitro* gereinigtem OpuAR und der *opuAA*-Promotorregion mit und ohne Bindemotiv aus *B. infantis* NRRL B-14911.

(1-5) PCR Fragment mit kompletter intergene Region von *opuAR* und *opuAA* mit abfallender OpuAR Konzentration (3 µg, 2 µg, 1 µg, 0,15 µg und 0,015 µg). (6-10) PCR Fragment mit kompletter intergener Region von *opuAR* und *opuAA* ohne putatives Bindemotiv (Deletion der Basenpaare GTACAGTTCAAAGTGTAC) mit abfallenden Konzentrationen von OpuAR (3 µg, 2 µg, 1 µg, 0,15 µg und 0,015 µg). OpuAR scheint trotz Deletion des Bindemotivs teilweise an der DNA vor *opuAA* binden zu können. Die Ergebnisse dieses EMSA sind dennoch höchst kritisch zu betrachten, da der größte Anteil an eingesetztem Protein aggregiert vorliegt.

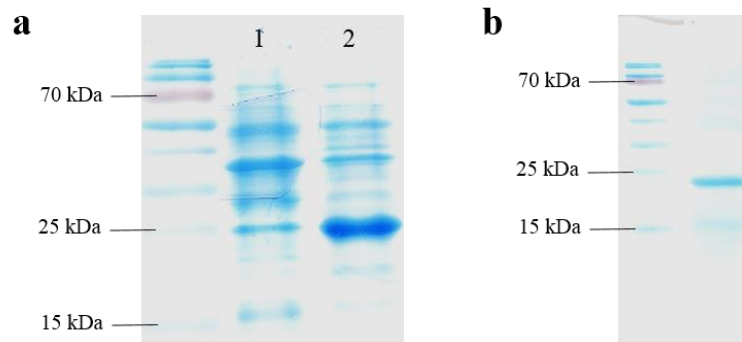


Abbildung 66: SDS-Gele der Überproduktion und des gereinigten CudC aus *S. xylosus* C2A.

Die Abbildung zeigt die Analyse der Überproduktion (a) des CudCs aus *S. xylosus* C2A. Die Auftrennung erfolgte über ein SDS-Gel. Es wurde jeweils eine Probe der Zellen vor (1) und nach (2) der Zugabe von AHT aufgetragen. (b) zeigt das gereinigte CudC. Die CudC ist 22,81 kDa groß.

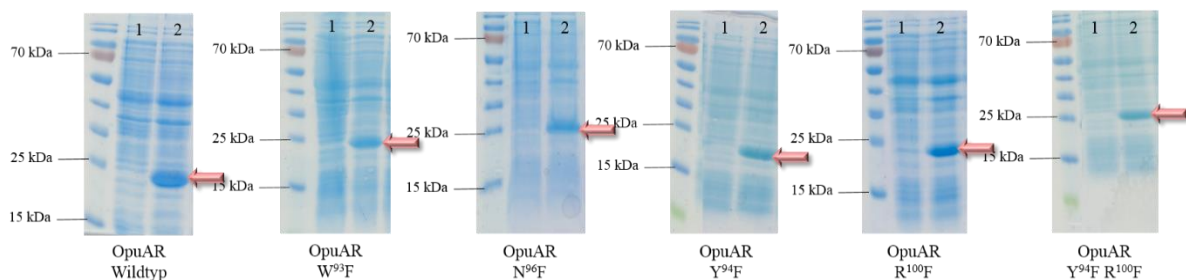


Abbildung 67: SDS-Gele der Überproduktion der OpuAR-Mutanten.

Die Abbildung zeigt die Analyse der Überproduktion der einzelnen OpuAR-Mutanten, bei der die Auftrennung über ein SDS-Gel erfolgte. Es wurde jeweils eine Probe der Zellen vor (1) und nach (2) der Zugabe von AHT aufgetragen. Die Mutanten sind jeweils 22,7 kDa groß.

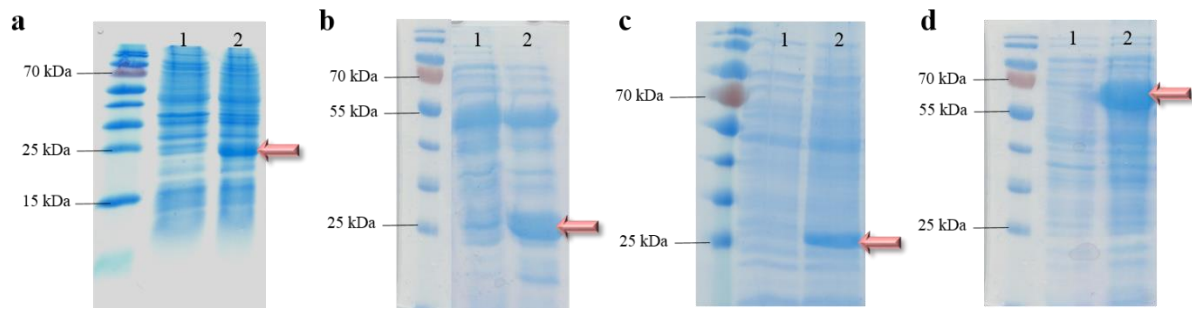


Abbildung 68: SDS-Gele des unterschiedlich überproduzierten GbsR aus *B. subtilis*.

Die Abbildung zeigt die Analyse der Überproduktion der einzelnen GbsRs. Die Auftrennung erfolgte über ein SDS-Gel. Es wurde jeweils eine Probe der Zellen vor (1) und nach (2) der Zugabe von AHT aufgetragen. (a) zeigt das GbsR (22,7 kDa) in *E. coli* BL21, (b) in *E. coli* Arctic Express (DE3) RIL und (c) in *B. megaterium* produziert. Die Überproduktion des GbsR mit N-terminalem Maltosebindeprotein in (d) zu sehen. Dieses Protein wurde in *E. coli* BL21 heterolog exprimiert.

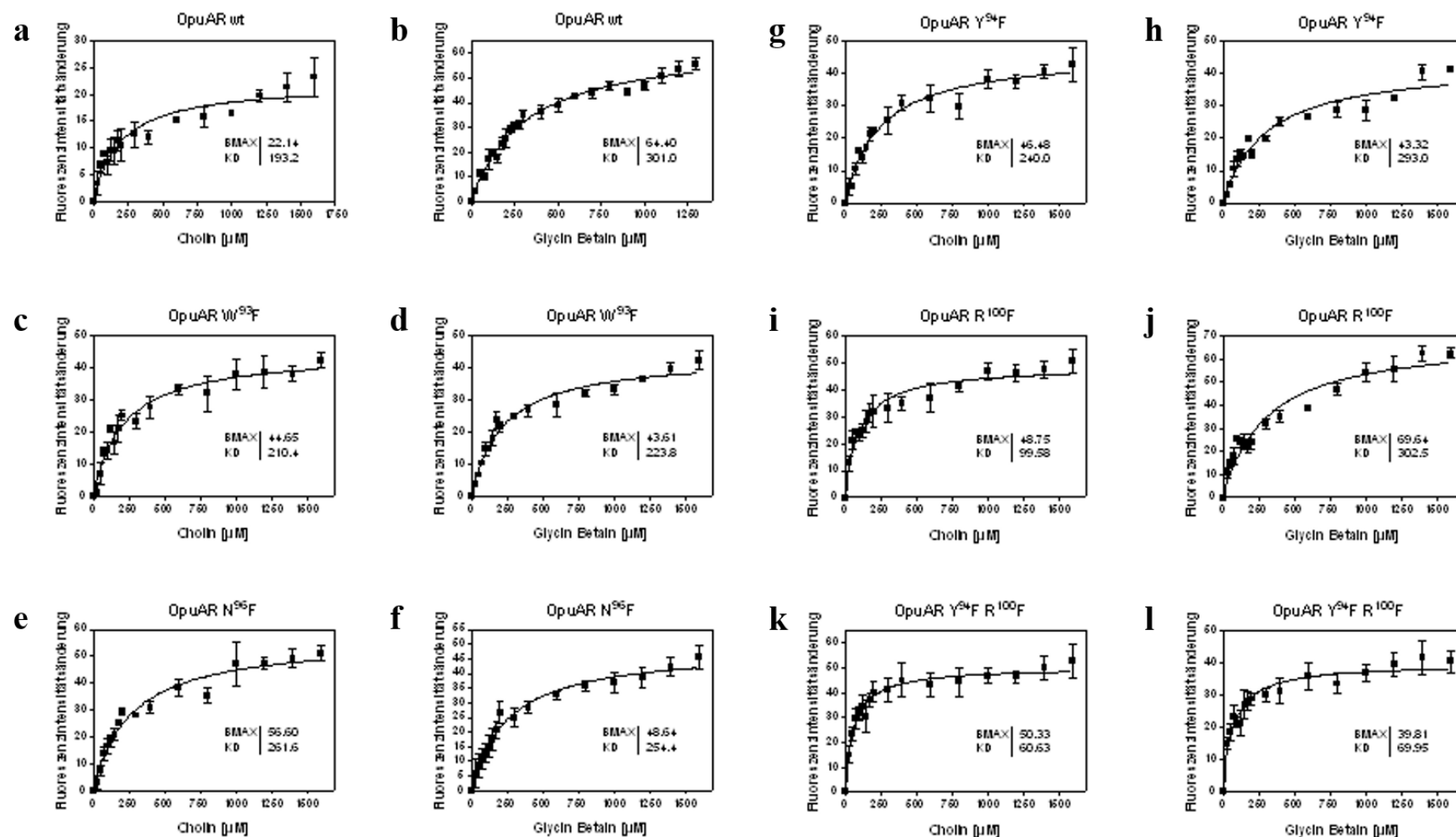


Abbildung 69: Sättigungskurven der OpuAR-Mutanten.

Dargestellt sind alle Sättigungskurven des OpuAR-Wildtyps (a) & (b) und der fünf Mutanten (c)-(l). Es wurde jeweils eine K_D mit Cholin (a), (c), (e), (g), (i) & (k) und mit Glycin Betain (b), (d), (f), (h), (j) & (l) gemessen.

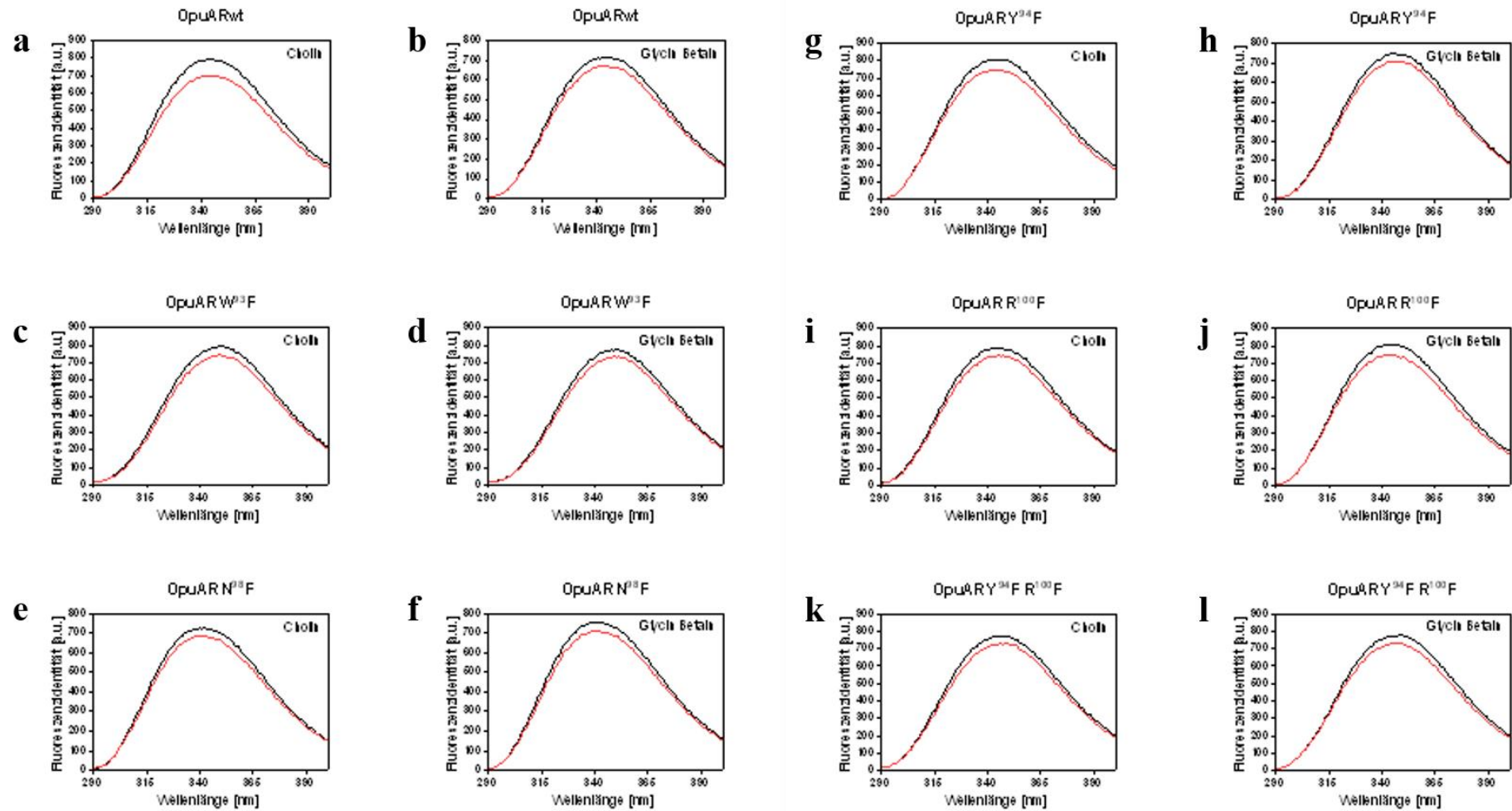


Abbildung 70: Intensitätsänderung der OpuAR-Mutanten.

Dargestellt sind alle Intensitätsänderungen des OpuAR-Wildtyps (a) & (b) und der fünf Mutanten (c)-(l). Es wurde jeweils eine Intensitätsänderung mit Cholin (a), (c), (e), (g), (i) & (k) und mit Glycin Betain (b), (d), (f), (h), (j) & (l) gemessen.

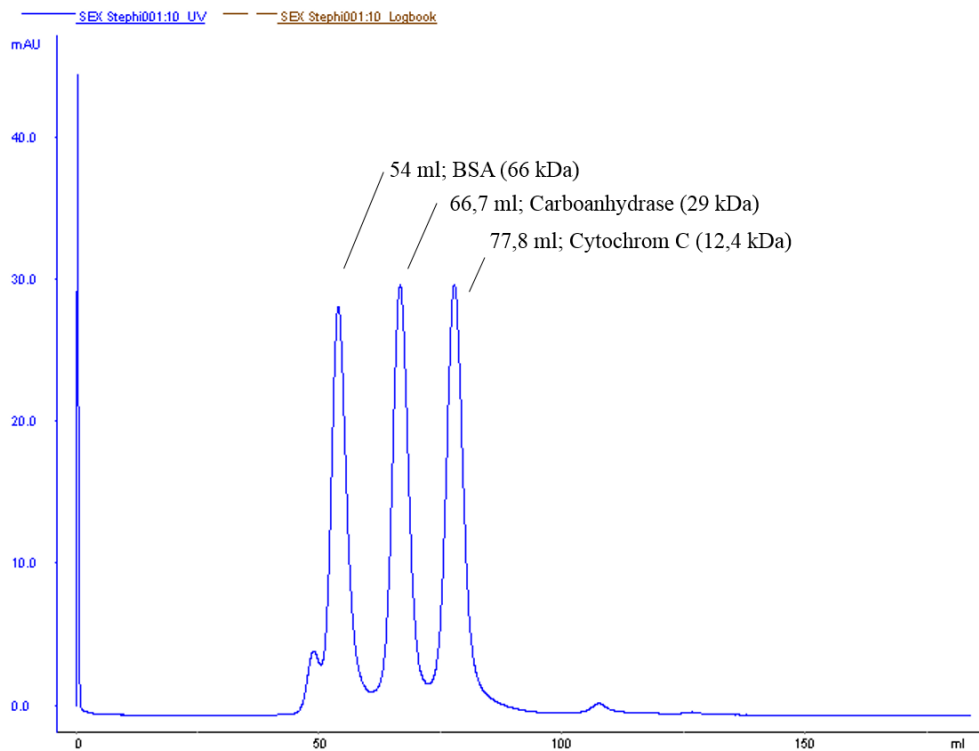


Abbildung 71: Gelfiltrationslauf der drei Markerproteine auf der HiLoad Superdex 80pg.

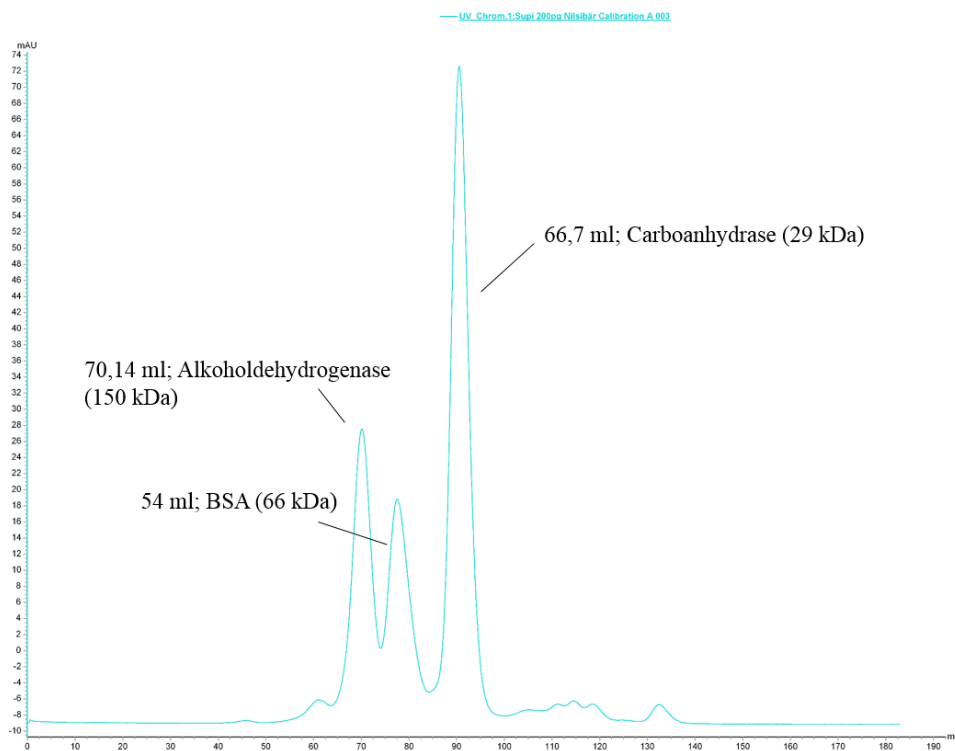


Abbildung 72: Gelfiltrationslauf der drei Markerproteine auf HiLoad Superdex 200pg.

8. Danksagung

Als allererstes möchte ich an dieser Stelle Herrn **Prof. Dr. Erhard Bremer** ansprechen. Ich möchte mich bei Ihnen für die freundliche "Wiederaufnahme" in Ihre Arbeitsgruppe bedanken. Ihre wirklich hervorragende Betreuung wusste ich sowohl während meiner Bachelorarbeit als auch während der gesamten Doktorandenzeit stets zu schätzen. Vielen Dank dafür!

Ein weiterer Dank geht an Herrn **Prof. Dr. Michael Bölker**, zum einen für die tolle Zeit in unserer Graduiertenschule des SFB987 und zum anderen für die Bereitschaft diese Arbeit als Zweitgutachter zu bewerten.

Dr. Tamara Hoffmann möchte ich für ihr stets offenes Ohr und ihre Ausdauer in "Laborangelegenheiten" danken.

Ich möchte mich außerdem bei meinen Bachelorstudenten und Praktikanten für die Zusammenarbeit an meinem Thema danken. Hier spreche ich direkt **Aneta Želazo, Ludmila Enz** und **Ole Schumann** an.

Ein sehr großer Dank geht auch an **Maritha Lippmann, Jutta Gade, Daniela Störmer** und **Jochen Sohn**. Ihr habt alle einen tollen Beitrag zu meinem "Gesamtkunstwerk" durch eure Kompetenz und euer Engagement beigetragen. Bessere technische Assistenten kann sich eine Arbeitsgruppe nicht wünschen!

Meiner lieben Freundin **Alexandra Jost** möchte ich auch gerne danken. Zum einen für das gewissenhafte Korrekturlesen und zum anderen für die vorzügliche Unterhaltung während des Schreibens :-D

Jetzt zu meinen Lieblingen der Arbeitsgruppe. Nein, nicht den Bacillen ;-), sondern allen anderen PhDs, Master- und Bachelorstudenten. Besonders **Lauri Czech, Ini Binzen, Laura Teichmanni, Johanna Körnerlie & Dani Stecker** danke ich für Eure ganz wunderbare Gesellschaft und Eure ganz besondere Freundschaft.

Lauri, du bist die beste Laborpartnerin die ich mir je vorstellen kann! Ich habe jede Stunde und besonders jedes Gespräch von Fuchs zu Fuchs ☺ mit dir genossen. Und immer dran denken, Fuchs ist man oder nicht. Fuchs kann man nicht werden!

Meinen wirklich besonders tollen **Eltern** danke ich, dass sie die letzten 28 Jahre "Stefanie" so tapfer überstanden haben. Ihr habt mich auf meinem gesamten Ausbildungsweg immer hervorragend begleitet und habt immer geholfen, dass ich das Bestmögliche aus mir rausholen konnte!!!

Zum Schluss möchte ich von ganzem Herzen dem **allerbesten Ehemann** und Freund danken. Du hast mich ausnahms- und bedingungslos über die ganzen Jahre, in denen wir uns kennen, bestmöglich unterstützt. Dank dir verfasse ich heute die letzten Zeilen meiner Doktorarbeit! Vielen Dank dir mein geliebter Eike.

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name	Ronzheimer
Vorname	Stefanie Irene
Geburtsname	Henkel
Geburtsdatum	09. Juli 1987
Geburtsort	Marburg
Familienstand	verheiratet

Promotion:

10.2012 – 09.2015	Promotion mit dem Schwerpunkt Mikrobiologie an der Philipps Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer Thema der Doktorarbeit: GbsR-Typ Regulatoren: Charakterisierung einer neuen MarR-Typ Regulator Familie von transkriptionellen Repressoren
seit 10.2012	Mitglied der Gradiertenschule des SFB987
seit 01.2013	Mitglied des Mentorinnen Netzwerks
seit 2014	Mitglied der VAAM

Studium:

10.2010 – 09.2012	Masterstudium "Molecular and Cellular Biology" an der Philipps Universität Marburg Masterarbeit mit dem Schwerpunkt Genetik
10.2007 – 05.2010	Bachelorstudium "Bachelor of Science" an der Philipps Universität Marburg Bachelorarbeit mit dem Schwerpunkt Mikrobiologie

10. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**"GbsR-Typ Regulatoren:
Charakterisierung einer neuen MarR-Typ Regulator Familie von
transkriptionellen Repressoren"**

Selbstständig verfasst, keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszweckn gedient.

.....
Stefanie Irene Ronzheimer

.....
Ort, Datum